Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Roemer

Histotopochemie der sauren Phosphatasen und unspezifischen Esterasen in Follikeln, Gelbkörpern und Hiluszellen des menschlichen Ovarium.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Ursula Hörnle geb. Dzubiel
aus
Friedrichshafen

8422

1965

Aus der Universitätsfrauenklinik Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Roemer

Histotopochemie der sauren Phosphatasen und unspezifischen Esterasen in Follikeln, Gelbkörpern und Hiluszellen des menschlichen Ovarium.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Ursula Hörnle geb. Dzubiel
aus
Friedrichshafen

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Dekan: Professor Dr. W. Schulte

1. Berichterstatter: Dozent Dr. P. A. König

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Roemer

1965

INHALTSÜBERSICHT

Seite

Einleitung 3

A. Saure Phosphomonoesterasen

1. Biochemie der sauren Phosphatasen..... 5
2. Funktion der sauren Phosphatasen im Stoffwechsel..... 8
3. Histochemie der sauren Phosphatasen.....13
   a) Metallsalzmethode.....13
   b) Azofarbstoffmethoden.....14
      α) Simultanmethode.....14
      ß) Sukzedanmethode.....16
   c) Indoxylmethode.....17
   d) Lokalisation.....17
4. Saure Phosphatasen im Ovar (Literaturübersicht).....20
5. Eigene Untersuchungen.....27
   a) Material und Methodik.....27
   b) Befunde.....32

B. Lipasen-Esterasen

1. Biochemie der Lipasen-Esterasen.....38
2. Funktion der Lipasen-Esterasen im Stoffwechsel.....41
3. Histochemie der Lipasen-Esterasen.....43
   a) Metallsalzmethode.....43
   b) Azofarbstoffmethoden.....45
   c) Indoxylmethode.....47
   d) Inhibitoren.....48
   e) Lokalisation.....50
4. Lipasen-Esterasen im Ovar.....52
5. Eigene Untersuchungen.....56
   a) Naphthol-AS-Acetat-Esterase.....56
      1) Material und Methodik.....56
      2) Hemmung.....58
      3) Befunde.....59
   b) Lipasen-Esterasen.....61
      1) Material und Methodik.....61

INHALTSÜBERSICHT (Forts.)

Seite

2) Befunde.....54

C. Auswertung der Ergebnisse.....67

Zusammenfassung.....72

Literaturverzeichnis.....77

E I N L E I T U N G

Der cyclische Wechsel von Funktion und Hormonproduktion im Ovar wurde in zahlreichen morphologischen und endokrinologischen Untersuchungen der Literatur bearbeitet. Zu den Problemen, die auch heute noch nicht ganz gelöst sind, gehört die Lokalisation der Hormonbildung in den Strukturen des Eierstocks.

Die Progesteronbildung in den Granulosaluteinzellen des Gelbkörpers ist seit den Untersuchungen von KAUFMANN (1953) und ZANDER (1957) bekannt.

Umstritten ist dagegen die Lokalisation der Oestrogenbildung. Die meisten Autoren (DUBREUIL 1950, BURKL und KELLNER 1954, FETZER u.a. 1955) nehmen an, daß die Oestrogene vorwiegend in den Thecazellen der Sekundär- und Tertiärfollikel, besonders auch der atretischen Follikel und im Corpus luteum, das im Blütestadium so viel Oestrogene enthält wie ein reifer Follikel, gebildet werden. Andere Autoren (STIEVE 1949, WALLART 1939, FEKETE 1953) halten das Follikelepithel für den Produktionsort. Die Frage ist unentschieden, weil das Follikelhormon nicht in den Zellen, in denen es nachgewiesen wurde, auch erzeugt werden muß. Es kann dort auch nur gespeichert sein.

Auch über eine Androgenbildung im Ovar liegen noch keine eindeutigen Befunde vor. Wahrscheinlich wird aber in den Hiluszellen (LEYDIG'sche Zwischenzellen) männliches Sexualhormon produziert. (STERNBERG 1949, DHOM 1954/55)

Einen Beitrag zur Klärung der Lokalisation der Hormonbildung vermag die Histotopochemie zu liefern, da mit dem Nachweis von Fermenten im Ovar stoffwechselaktive Strukturen mit entsprechender Enzymaktivität dargestellt werden können. Aus dem Enzymspektrum und der Kenntnis der Funktion des entsprechenden Enzyms im Stoffwechsel können ge-

wisse Rückschlüsse auf die Stoffwechselvorgänge oder die Art der Sekretion gezogen werden. Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zu diesem Problem vor.

Diese Arbeit befaßt sich mit den histochemischen Nachweisen und der Lokalisation der sauren Phosphatase und verschiedener Esterasen im menschlichen Eierstock und ergibt einen Beitrag zur endokrinen Funktion der Follikel, Gelbkörper und Hiluszellen.

A. SAURE PHOSPHATASEN

1. Biochemie der sauren Phosphatasen.

Als Phosphatasen werden Hydrolasen bezeichnet, die unter Wasseraufnahme Phosphorsäureester spalten. 1907 wurde erstmals ein Ferment mit Phosphatasewirkung beschrieben. (Lit. bei RICHTERICH 1958) Später klärte eine intensive Erforschung der Phosphatasen die Rolle der Phosphorsäureester im Intermediärstoffwechsel der Kohlehydrate. Heute stellen die Phosphatasen eine der weitgehendst untersuchten Klassen der Enzyme dar, wenn auch längst nicht alle Probleme geklärt sind. Über ihre biologische Bedeutung ist noch wenig bekannt. Es ist bisher auch nicht gelungen, eine Phosphatase kristallin darzustellen. Eine Ausnahme bildet die nur bedingt in diese Gruppe gehörende Nucleotidase. Eine Behauptung von THOAI et al., eine alkalische Phosphatase aus Rindernieren kristallin dargestellt zu haben, mußte fünf Jahre später widerrufen werden. (ABUL FAD'L et al. 1949)

Die Phosphatasen werden im allgemeinen in drei Gruppen eingeteilt, die Mono-, Di- und Triphosphatasen. (PEARSE 1954) Die Histochemie hat sich hauptsächlich mit den Phosphomonoesterasen befaßt, die die Monoester der Phosphorsäure hydrolysieren. Aus dieser Gruppe kennt man heute hochspezifische, nur einen bestimmten Ester spaltende Enzyme (wie z.B. Glucose-6-Phosphatase), gruppenspezifische oder isodynamische, die sich in ihrem Spezifitätsbereich nur geringfügig unterscheiden (z.B. Acylphosphatasen) und eine Reihe von unspezifischen Phosphomonoesterasen, die die verschiedensten biologisch vorkommenden oder synthetisch dargestellten Alkoholradikale aus Phosphorsäureestern abspalten.

Für die unspezifischen Phosphomonoesterasen wird eine schon 1936 von FOLLEY und KAY angegebene Eintei-

lung in vier Typen verwendet. Über ihre chemische Konstitution, wie die aller Phosphatasen, ist nur wenig bekannt. Die Typen I-IV der Phosphomonoesterasen sind durch diverse Aktivatoren und Inhibitoren, durch ein differentes pH-Optimum, durch die Hydrolyse-Geschwindigkeit mit den Substraten 1- und 2-Glycerophosphat und durch das physiologische Vorkommen zu unterscheiden. (ROCHE 1952, WALKER et al. 1953, HOFMANN-OSTENHOF 1954)

Die Phosphomonoesterasen des Typs I haben ein pH-Optimum bei 9 und werden als "alkalische Phosphatasen" zusammengefaßt. Sie sind im tierischen Gewebe weit verbreitet und in den letzten Jahren sehr eingehend untersucht worden. Die Typen II-IV der Phosphomonoesterasen haben ihr pH-Optimum im sauren Bereich und werden als "saure Phosphatasen" dem Typ I gegenübergestellt. Alkalische und saure Phosphatasen unterscheiden sich auch durch eine Inhibition durch verschiedene Stoffe. Die sauren Phosphatasen werden von Fluoriden gehemmt, aber nicht von Aminosäuren und SH-Gruppen, die für die alkalische Phosphatase starke Hemmer sind.

In Geweben wurde keine Phosphatase mit neutralem pH-Optimum gefunden. (KROON et al. 1944)

Über die drei Typen der sauren Phosphatase ist heute weniger bekannt als über die alkalische Phosphatase. Der Typ II der Phosphomonoesterasen ist im Tierreich weit verbreitet und findet sich auch bei Säugetieren, besonders in Prostata, Milz und Leber. Auch in höheren Pflanzen und Pilzen wurde das Enzym nachgewiesen. Die Fermente dieses Typs zeigen eine recht geringe Spezifität. Ein besonders wirksamer Inhibitor ist Fluorid. Ein Ferment dieses Typs wird als einzige Phosphomonoesterase im Harn ausgeschieden. Das pH-Optimum liegt um 5,5. wahrscheinlich bestehen diese Phosphomonoesterasen aus einem SH-Gruppen tragenden System, da sie durch eine Quecksilber-

verbindung gehemmt werden. (HERMAN und PADYKULA 1956) Möglicherweise besteht der Typ II der Phosphomonoesterasen aus einer Gruppe biologisch heterogener Enzyme. (RICHTERICH 1958) Der Typ III der Phosphomonoesterasen kommt in Leber, Milz, Erythrocyten, Schimmelpilzen und Hefe vor. Das pH-Optimum der Wirkung liegt zwischen 3,0 und 4,2. Hemmstoffe sind Mg-Ionen und Fluorid, während Cystein aktiviert. 2-Glycerophosphat wird schneller gespalten als das 1-Isomere. Für die Humanbiologie ist dieser Typ bedeutungslos. (RICHTERICH 1958) Die Phosphomonoesterasen des Typs IV finden sich in den Erythrocyten, in der Hefe und ebenfalls in Schimmelpilzen. Sie werden durch Mg-Ionen aktiviert. Das pH-Optimum liegt zwischen 5,0 und 6,0.

Mit den heute bekannten histochemischen Methoden ist es bei der noch ungenügenden Kenntnis ihrer Fehlerquellen wahrscheinlich nicht möglich, die verschiedenen unspezifischen sauren Phosphomonoesterasen eindeutig zu unterscheiden, (DEANE,BARNETT und SELIGMAN 1960) obwohl dies verschiedentlich behauptet worden war. (ABOLINS und ABOLINS 1949, MC GREGOR und STREET 1953) Mit anderen biochemischen Methoden wie z.B. Untersuchungen am Homogenat sind die verschiedenen Typen differenziert worden. (WALKER et al. 1953, FISHMAN und LERNER 1953, GOODLAD und MILLS 1957)

2. FUNKTION DER SAUREN PHOSPHATASEN IM STOFFWECHSEL

Die Phosphatasen spielen im Intermediärstoffwechsel eine wichtige Rolle, weil es als Zellbestandteile und als Zwischenprodukte des Stoffwechsels eine Unzahl von Phosphorsäureestern gibt. Hier sind nur Nucleinsäuren, Phosphatide oder Phosphorsäureester im Kohlenhydratstoffwechsel zu erwähnen.

Nach der Definition der Phosphatasen wurde lange Zeit angenommen, ihre Funktion im Stoffwechsel sei die Hydrolyse dieser Phosphorsäureester. Die naheliegende Vermutung, die Umkehr dieser Funktion, die Synthese von Phosphaten sei in vivo ebenfalls möglich, wurde aus energetischen Gründen für unwahrscheinlich angesehen. (SUMNER und SOMERS 1953)

Neuere Untersuchungen zeigten aber, daß die Phosphatasen noch andere Funktionen haben. 1948 wurden erstmals Beobachtungen über die Transferasefähigkeit der Phosphatasen mitgeteilt. APPLEYARD stellte fest, daß die Prostataphosphatasen, die schon lange bekannt und weitgehend untersucht sind, Phosphatgruppen von Phenolphtaleinphosphat auf verschiedene Alkohole übertragen. AXELROD wies in Anwesenheit energiereicher Verbindungen die Übertragung von Phosphatgruppen von einem Donator auf einen Akzeptor durch die saure Phosphatase von Zitrusfrüchten nach. Die Phosphatübertragung von Phosphokreatin, Phosphopyruvat u.a. auf Glycerin und von Acetylphosphat auf verschiedene Zucker wurde 1952 von GREEN und MEYERHOF beschrieben. MORTON zeigte 1955, daß gereinigte Prostataphosphatase Phosphatgruppen von Natrium-B-glycerophosphat oder Kreatininphosphat auf Glucose überträgt. Dieser Autor fand auch, daß die Transphosphorylierung nicht nur unter Energieverlust ablaufen kann, sondern auch zwischen Estern mit ähnlicher Bindungsenergie.

Einzelne Befunde sprachen für die Fähigkeit der Phosphatasen zur Synthese von Phosphorsäureestern.

SCHNEIDER und LORING konnten 1956 aus einem Nucleosid und anorganischem und organischem Phosphat drei isomere Mononucleotide synthetisieren. Die synthetisierende Funktion der Lipasen war schon länger bekannt. (KORNBERG und PRICER 1953, DE DUVE 1959) Nach HOFFMANN-OSTENHOF (1954) gelingt die Synthese von Phosphorsäureestern durch Phosphatasen zwar unter extremen Laborbedingungen, ist aber in vivo sehr unwahrscheinlich. Nach DE DUVE 1959 ist die Synthese nur bei sehr hoher Substratkonzentration oder in Abwesenheit von Wasser möglich und deshalb für die meisten biologischen Substrate sicher nicht anzunehmen.

Nach den Untersuchungen von BALDWIN (1952), MEYERHOF und GREEN (1950), DAVISON-REYNOLDS (1954) und AXELROD (1955) besteht die physiologische Funktion der Phosphatasen wahrscheinlich in der Übertragung des Phosphatrestes. Eine Transferasefähigkeit der Phosphatasen ist auch sicher vorhanden, weshalb die hydrolytischen Phosphatasen grundsätzlich als Phosphoryltransferasen angesehen werden können. Es ist aber heute noch nicht bekannt, wie weit die Transferasefähigkeit für die physiologische Funktion der Phosphatasen eine Rolle spielt. (AMMON und DIRSCHERL 1959) DE DUVE (1959) glaubt, daß die Phosphatasen nur ausnahmsweise Synthesen oder Transferierungsvorgänge katalysieren, sondern meistens echte Hydrolysen.

Die Vermutung, daß es für die verschiedenen Funktionen verschiedene, wenn auch nahe verwandte Enzyme gäbe, bestand eine Zeit lang (AXELROD 1948), sicher zu unrecht. LONDON und HUDSON bewiesen 1955 die Identität des Phosphatester-spaltenden und Phosphat-transferierenden Enzyms der menschlichen Prostata und des Plasmas von Patienten mit Prostatacarcinom. Auch RICHTERICH (1958) meint, daß ein und dasselbe Enzym unter geeigneten Milieubedingungen alle drei Reaktionen katalysieren kann. Ob es sich dabei um eine Eigentümlichkeit der Phosphomonoesterasen

handelt, wie es von MORTON (1953) angenommen wird, ist noch nicht bekannt.

Zur Unterscheidung der sauren und alkalischen Phosphatasen ist auszuführen: Seit 1923 ROBISON die Aufgaben der alkalischen Phosphatase bei der Verknöcherung beschrieb, befaßten sich zahlreiche Untersuchungen mit der Funktion dieses Enzymes. Aus den Mitteilungen der Literatur ist bekannt, daß die alkalische Phosphatase außer bei der Ossifikation beim Transport von Glucose oder anderen Zuckern (z.B. Fructose in der Samenblase) und bei der Synthese fibrillärer Proteine eine wichtige Rolle spielt. (RICHTERICH 1958) Neben diesen spezifischen Aufgaben hat die alkalische Phosphatase durch ihre Transphosphorylierungsfähigkeiten sicher allgemeine Bedeutung im Zellstoffwechsel, worauf auch ihre Verteilung in Kernen und Mikrosomen der Zellen (DE DUVE 1959) hinweist.

Im Vergleich zu den alkalischen Phosphatasen sind die sauren weniger eingehend untersucht worden, was hauptsächlich durch die bis vor wenigen Jahren diffizilen Nachweismöglichkeiten und durch ihre geringere Konzentration in den meisten Geweben (außer in der Prostata) bedingt ist. So war die spezielle Funktion der sauren Phosphatasen bis in neueste Zeit fast unbekannt (VAN FLEET 1961) und auch heute haben die diesbezüglichen Annahmen noch immer den Wert von Hypothesen. Noch vor einigen Jahren wurde den sauren Phosphatasen nur eine wesentliche Rolle im Prostatasekret zuerkannt, wo sie wahrscheinlich die Fructose freisetzen, die für die Ernährung der Spermien nötig ist. (PEARSE 1954) Inzwischen wurden mit den besseren Nachweismöglichkeiten und den genaueren Kenntnissen über ihre Lokalisation auch einige Kenntnisse über ihre Funktion im Stoffwechsel der Zelle gewonnen.

Aus dem Nachweis der sauren Phosphatase in zytoplasmatischen Granula wurde eine besondere Rolle

im Stoffwechsel des Zytoplasmas abgeleitet. So wurde eine Beteiligung der sauren Phosphatasen bei der Mucopolysaccharidbildung (KROON 1952) und der Proteinsynthese angenommen. (WALKER 1953) 1956 vermutete VERNE zudem eine Mitwirkung der sauren Phosphatase bei der Nucleinsäuresynthese, bei Austauschvorgängen zwischen Kern und Plasma, beim Faseraufbau und Absorptionsvorgängen. EICHNER (1958) fand, daß an manchen Stellen im Auge die sauren Phosphatasen häufig mit zytoplasmatischen Ribonucleinsäuren vergesellschaftet sind und nahm eine wechselseitige Beziehung zwischen beiden Stoffgruppen an. Auch Beobachtungen anderer Untersucher wiesen darauf hin. (REBOLLO 1955) GÖSSNER (1958) glaubt ebenso, daß die Phosphatasen (saure und alkalische) Beziehung zum Kohlehydrat-, Nucleinsäuren- und Proteinstoffwechsel haben.

Alle diese Annahmen haben sich bisher nicht sicher beweisen, aber auch nicht widerlegen lassen. In jüngster Zeit ist nun von verschiedenen Autoren eine neue Deutung der Funktion der sauren Phosphatasen gegeben worden. Aus der intracellulären Lokalisation in den Lysosomen schlossen sie bezüglich der Funktion, daß die Lysosomen und mit ihnen die sauren Phosphatasen eine Bedeutung für die intracelluläre Verdauung haben, (DE DUVE 1959, NOVIKOFF 1959, LOBEL et al. 1961, DEANE et al. 1962) was DE DUVE im weitesten Sinne als Hydrolyse endogener Bestandteile auffaßt. Solche verdauenden Prozesse finden nicht nur bei der Phagocytose und Autolyse, sondern auch während der Regression und Nekrobiose der Zellen statt.

Möglicherweise wird die gesunde Zelle vor der destruktiven Wirkung der Hydrolasen in den Lysosomen durch die Undurchlässigkeit der lysosomalen Membran geschützt, die eine Diffusion der Substrate in die Lysosomen und der Enzyme aus den Lysosomen verhindert. Die Autolyse beginnt, wenn die Membran

durchlässig wird und die leicht löslichen Fermente in das Zytoplasma austreten. Die Ursache der Durchlässigkeit der Membran bei der Autolyse ist noch nicht klar. Nach DE DUVE trennen sich die hydrolytischen Enzyme von ihren Partikeln, wenn der O_2-Druck in der Zelle abnimmt. Histochemisch kann die Membran durch Gefrieren und Wiederauftauen der Zelle durchlässig gemacht werden. (GIANETTO und DE DUVE 1955)

Ob die Lysosomen wirklich der einzige Ort eines Vorkommens saurer Phosphatasen sind, ist in letzter Zeit wieder angezweifelt worden. (DEANE et al. 1962) Das Ferment soll möglicherweise auch noch in anderen zytoplasmatischen Lagen vorkommen, wo seine Funktion nicht mit der intracellulären Verdauung zusammenhängt. Bewiesen ist dies jedoch nicht. Auch die Funktion der sauren Phosphatasen in den Wänden von kleinen und mittleren Blutgefäßen ist ganz unklar.

3. HISTOCHEMIE DER SAUREN PHOSPHATASEN

a) Metallsalzmethode

Die histochemische Untersuchung der unspezifischen Phosphomonoesterasen begann 1939, als TAKAMATSU und GOMORI unabhängig voneinander zwei Methoden zum Nachweis der alkalischen Phosphatase publizierten. 1941 teilte GOMORI eine erste Methode zum Nachweis der sauren Phosphatase mit. Beide Techniken zur Lokalisation der alkalischen und sauren Phosphatase beruhen auf der Bildung eines schwerlöslichen Phosphats an der Stelle der Fermentaktivität und dessen Überführung in ein gefärbtes Sulfid. Bei alkalischem pH war das Reaktionsprodukt ein Kalziumsalz, da Kalziumphosphat im sauren Bereich aber gut löslich ist, schlug GOMORI Bleinitrat zum Nachweis der sauren Phosphatase vor. Das sich bildende schwerlösliche Bleiphosphat wird durch verdünntes, gelbes Ammoniumsulfid in schwarz-braunes Bleisulfid überführt. Die Methode ist zwar sehr einfach, das Ergebnis allerdings nicht ganz ideal. Schon GOMORI selbst beschrieb den Reaktionsausfall als ungleichmäßig, was wiederholt bestätigt wurde. Als Ursache wurde zunächst eine ungleichmäßige Inaktivierung des Enzyms durch Fixierung und Einbettung angenommen. (WOLF et al.1943) Bald wurde jedoch erkannt, daß die Bleiionen diese falschen Resultate bedingen. Von mehreren Autoren, die die von GOMORI angegebene Methode nachuntersuchten, wurden verschiedene Artefakte beschrieben. Am Rande des Präparates fand nur eine ziemlich schwache, in der Mitte dagegen eine sehr starke Reaktion statt. (PALADE 1951) In nahezu allen Präparaten fand sich eine starke Kernfärbung, besonders auch in den Nucleoli. Wie unten näher ausgeführt wird, ist es heute ganz sicher, daß es sich hier um Artefakte handelt, die durch eine unspezifische Bleiablagerung zustande kommen. Von verschiedenen Nachuntersuchern wurde die

Methode deshalb kritisiert. (NEWMAN et al. 1950, TAKEUCHI und UTSUNOMIJA 1952)

GOMORI hat 1950 eine verbesserte Technik empfohlen, in der er ein optimales Verhältnis von Puffer-, Substrat- und Bleiionenkonzentration angibt. Der Artefakt der Kernfärbung konnte allerdings auch hier nicht vermieden werden.

Eine wesentliche Verbesserung der Ergebnisse brachte 1951 der Vorschlag von SELIGMAN et al., statt der von GOMORI ursprünglich empfohlenen Aceton-fixierten Paraffinschnitte Formalin-fixierte Gefrierschnitte zu verwenden, da die Aktivität der sauren Phosphatase durch Fixation und Einbettung viel stärker beeinträchtigt wird als die der alkalischen Phosphatase. (NOVIKOFF 1955)

Von verschiedenen Autoren wurden andere Modifikationen der ursprünglichen GOMORI-Methode vorgeschlagen. TANDLER (1953) verwendete Kobalt als Metallion, GOETSCH und REYNOLDS (1951,52) entparaffinierten erst nach der Inkubation. Die Methode wurde aber dadurch nicht wesentlich verbessert.

b) Azofarbstoffmethoden

α) Simultanmethode

Eine einfache histochemische Technik ist die von MENTEN et al. 1944 zum Nachweis der Hydrolasen eingeführte Azofarbstoffmethode, die heute wohl das gebräuchlichste Verfahren auf diesem Gebiet der Histochemie ist. Ihr Prinzip ist die Kupplung des durch enzymatische Hydrolyse freigesetzten Naphthol oder anderer Phenolderivate mit Diazoniumsalzen unter Bildung eines unlöslichen Azofarbstoffes. Diese Reaktion war schon seit Jahrzenten in der Farbstoffchemie bekannt.

Zum Nachweis der sauren Phosphatasen hat zum ersten Male YIN 1945 diese Technik angewandt, als er die von MENTEN et al. für die alkalische Phos-

phatase beschriebene Methode (mit Kalzium-2-naphthylphosphat und frisch diazotiertem 1-Naphthylamin) bei pH 6 ausführte. SELIGMAN und MANHEIMER haben 1949 die Verwendung von 1-Naphthylphosphat und stabilisiertem Anthrachinon-1-diazoniumchlorid bei pH 5 vorgeschlagen. Bei saurem pH kuppelt der 1-Ester schneller als das 2-Isomere. Die Verwendung des stabilisierten Diazoniumsalzes war eine große Verbesserung, da vorher das Diazotat immer frisch hergestellt werden mußte, was eine zeitraubende und nicht immer ungefährliche Arbeit war.

Die Ergebnisse dieser Methode stimmen gut mit denen der Metallsalzmethode von GOMORI überein, was die Verteilung der sauren Phosphatase in normalen menschlichen Geweben anbetrifft. Die Lokalisation des Enzyms fand sich vorwiegend im Zytoplasma. Doch wurden bei längeren Inkubationszeiten ebenfalls die Kerne angefärbt.

Die Naphtholester scheinen, obwohl physiologisch nicht vorkommend, als Substrat gut geeignet, da sie schnell hydrolysiert werden und keine spontane Zersetzung des Substrats stattfindet. (GOMORI 1952, PEARSE 1954)

Wesentlich verbessert wurde die Azofarbstoffmethode von GROGG und PEARSE 1952. Sie verwendeten statt Aceton-fixierter Paraffinschnitte Formalin-fixierte Gefrierschnitte, bei denen der Verlust der Enzymaktivität wesentlich geringer war. Als Substrat benützten sie statt des schwerlöslichen Kalziumsalzes Natrium-1-naphthylphosphat. Sie testeten eine Reihe von Diazoniumsalzen und erhielten die besten Ergebnisse mit Echtblausalz B, einem stabilisierten tetraazotierten o-Dianisidin. Durch diese Verbesserungen der Methode wurden die Inkubationszeiten wesentlich verkürzt und der störende Artefakt der Kernfärbung vermieden. Der sich bildende Azofarbstoff zeigt sich als dunkelroter, scharf lokalisierbarer

Niederschlag. (Eigenartigerweise ändert sich die Farbe mit dem pH. Im alkalischen Milieu ist der Farbstoff schwarz, im neutralen erst rot, dann schwarz, im sauren rot. Der Grund ist wahrscheinlich, daß das 1-Naphthol doppelt und zwar in para- und ortho-Stellung kuppelt.)(BURTON 1954 b, GÖSSNER 1958)

Obwohl die Methode von GROGG und PEARSE gute Ergebnisse liefert, hat es nicht an Verbesserungsvorschlägen gefehlt. BURTON (1954a) empfiehlt eine Erhöhung der Echtblausalz-B-Konzentration, die Inkubation bei 37° und einen Aktivator "Percain". Diese Modifikation wurde aber wieder kritisiert (RUTENBURG und SELIGMAN 1955). GÖSSNER berichtet 1958 von sehr guten Ergebnissen bei der Verwendung von Echtrotsalz ITR. Auch an Stellen großer Enzymaktivität sollen keine Diffusionsartefakte auftreten. BARKA (1960) glaubt, daß "hexazonium pararosanilin" eine bessere Lokalisation der sauren Phosphatase ergäbe als alle übrigen Salze.

ß) Sukzedanmethode

1954,1955 veröffentlichten RUTENBURG und SELIGMAN eine "post-incubation coupling technique". Als Substrat verwendeten sie den Phosphorsäureester des schwerlöslichen 6-Benzoyl-2-naphthol. Diese Verbindung wird bei saurem pH sehr fest an Protein angelagert. Die Kupplung erfolgt später im alkalischen Milieu mit tetraazotiertem Dianisidin. Der Farbstoff fand sich bei kurzen Inkubationszeiten von 1 Minute-2 Stunden nur im Zytoplasma. Dabei wurden auch keine Diffusionsartefakte beobachtet.

Obwohl das Verfahren noch nicht vollständig ausgearbeitet ist, ist es nach GOMORI (1956) bis jetzt wahrscheinlich die beste Methode zum Nachweis der sauren Phosphatase. Von BURSTONE wurde die Methode 1958 wegen der Artefakte kritisiert.

c) Indoxylmethode

Zum Nachweis einer Reihe von Hydrolasen wurde das Indoxylesterverfahren entwickelt. (BARNETT und SELIGMAN 1951, HOLT 1952a) Dabei entsteht durch enzymatische Hydrolyse Indoxyl, das bei alkalischem pH durch Luftsauerstoff zu Indigo oxydiert wird. Die Methode ist unkompliziert, hat aber einige Nachteile. Selbst in alkalischem Milieu geschieht die Umsetzung durch atmosphärischen Sauerstoff nur langsam, so daß Diffusionsartefakte entstehen können. Zu ihrer Verhinderung wurden Oxydationsreagentien zugesetzt (z.B. Kaliumferricyanid)(HOLT 1954). Diese Zusätze üben aber meist einen hemmenden Einfluß auf die Fermentaktivität aus.

HOLT berichtete zwar 1954 über eine Methode zum Nachweis der sauren Phosphatase mit 5-Bromindoxylphosphat. Da die Oxydationsgeschwindigkeit bei saurem pH aber außerordentlich langsam ist, muß bei dieser Methode zumindest mit größeren Diffusionsartefakten gerechnet werden. BARNETT (1952b) glaubte, daß die Indoxylmethode nur bei alkalischem pH möglich sei, während PEARSE (1954b) dies auch bei saurem pH annahm.

d) Lokalisation

Als Ergebnis der Metallsalzmethode von GOMORI fand sich ein schwarz-brauner, feiner Niederschlag, der überwiegend in den Kernen, besonders auch in den Nucleoli, lokalisiert war. Es zeigte sich aber auch eine Schwärzung von Zellkernen und Nervenfasern in Schnitten, bei denen die Enzymaktivität zuvor zerstört worden war. (LASSEK 1947, NEWMAN et al. 1950) Verschiedene Nachuntersucher fanden bei niedrigerem pH (5) eine stärkere Färbung der Kerne, bei höherem (pH 6) war mehr das Zytoplasma gefärbt. (ABOLINS und ABOLINS 1949, TAKEUCHI und UTSUNOMIJA 1952) Es ist anzunehmen, daß entweder Bleiphosphat oder Bleiionen in den Kernen ohne Enzymbeteiligung bevorzugt abgela-

gert werden und diese Artefakte bedingen. CLARKSON und KENCH vermuteten 1958, daß Blei als Metallkomplex, als Chelat oder vielleicht als disperses kolloidales Metallsalz niedergeschlagen werde. Bei Vergleich der Ergebnisse dieser histochemischen Methode mit anderen biochemischen Untersuchungen ergibt sich eine erhebliche Diskrepanz.

PALADE untersuchte 1951 in einem Parallelversuch die Lokalisation der sauren Phosphatase in Leberschnitten mit der Metallsalzmethode von GOMORI und im Homogenat. Er fand im Leberhomogenat 95 % des Enzyms in der Zytoplasmafraktion. Nur 5 % waren in der Kernfraktion nachzuweisen, die PALADE auf die Verunreinigung dieser Fraktion mit Plasmabestandteilen zurückführte. Seine Ergenisse stimmten auch mit denen anderer Autoren überein, so daß er die Kernfärbung mit der verbesserten Metallsalzmethode nach GOMORI nachgewiesenermaßen für einen Artefakt hält und neben anderen (PEARSE 1954) glaubt, daß diese Methode zur intracellulären Lokalisation der sauren Phosphatase ungeeignet ist.

BERTHET und DE DUVE fanden 1951 im Leberhomogenat allein 55-60 % der gesamten sauren Phosphataseaktivität in der Mitochondrienfraktion, während der Anteil in der Kernfraktion ganz gering war. Diese Autoren zeigten auch, daß ein großer Teil der sauren Phosphatase an kleine zytoplasmatische Granula in der Nähe der Mitochondrien gebunden ist. (BERTHET et al. 1951, DE DUVE und BERTHET 1954)

Die Befunde wurden später von anderen Autoren bei Untersuchungen am Homogenat bestätigt. (GIANETTO und DE DUVE 1955, APPELMANS 1955) Ursprünglich wurde eine Identität dieser Granula mit den Mitochondrien angenommen, was später als Irrtum erkannt wurde. APPELMANS et al. fanden 1955, daß die Mitochondrien frei von saurer Phosphatase, aber bei der normalen Aufarbeitung des Homogenates mit anderen Granula ver-

unreinigt sind, die einen sehr hohen Gehalt an Enzym aufweisen. Diese Granula sind keine Mikrosomen und in der Größe kleinen Mitochondrien vergleichbar. Später wurden die neuentdeckten Granula Lysosomen genannt (DE DUVE et al. 1955) und ihr reicher Gehalt an saurer Phosphatase bestätigt. (DE DUVE 1959, NOVIKOFF 1959, LOBEL, ROSENBAUM und DEANE 1961). Sie sind etwa 0,3-0,5 groß und besitzen eine semipermeable Membran. Außer saurer Phosphatase enthalten sie nech andere Hydrolasen mit saurem pH-Optimum wie z.B. die nicht mikrosomale ß-Glucuronidase, Kathepsin (A, B und C), Aminopeptidase, Arylsulfatase A und B, ß-N-Acetylglucosaminidase u.a. (NOVIKOFF 1961) Sie sind der einzige Ort in der Zelle, wo saure Phosphatase in größerer Menge vorkommt. (SCARPELLI und PEARSE 1958)

Ein Vergleich der Ergebnisse dieser Untersuchungen am Homogenat mit denen der Azofarbstoffmethode, besonders der verbesserten Methode von GROGG und PEARSE ergibt eine gute Übereinstimmung. Bei kurzen Inkubationszeiten findet sich bei der Azo-Kupplungsreaktion die Aktivität zu 100 % im Zytoplasma. Das Enzym ist gleichmäßig über das Zytoplasma der ganzen Zelle verteilt. (BURTON 1954) Erst bei langen Inkubationszeiten tritt auch Kernfärbung auf, was sicher ein Diffusionsartefakt ist.

Auch die "post-incubation coupling technique" von RUTENBURG und SELIGMAN zeigte die gleiche Lokalisation der sauren Phosphatase. Der Farbstoff fand sich nur im Zytoplasma. In Kernen und Bindegewebsfasern lag keine Aktivität vor. Bei kurzen Inkubationszeiten wurden keine Diffusionsartefakte beobachtet.

Trotz der guten Lokalisation sind die letztgenannten Methoden aber nicht so genau, daß allein aus ihren Ergebnissen mit Bestimmtheit eine Lokalisation des Enzyms in zytoplasmatischen Granula erfolgen kann (PEARSE 1954b).

4. SAURE PHOSPHATASEN IM OVAR

In den letzten Jahren sind verschiedene Enzyme im Ovar untersucht und nachgewiesen worden. Bei den Phosphatasen hat man sich dabei überwiegend mit den alkalischen befaßt. Die meisten Untersuchungen betreffen Ovarien von Tieren. DEANE 1952, VERNE und HEBERT 1952, AUGUSTIN et al. 1954, FORD und HIRSCHMAN 1955 und MALONE 1960 haben alkalische Phosphatasen in Rattenovarien, FUICCHIO und LO SARDO 1958 und FUICCHIO et al. 1958 in Ziegen-Ovarien nachgewiesen. YASUDA 1953 untersuchte den Eierstock des Kaninchens und YAO 1950 Drosophila melanogaster. Eine zusammenfassende Übersicht über das Vorkommen von alkalischer Phosphatase in Ovarien von verschiedenen Tieren teilte ARVY 1960 mit.

Wegen der technischen Schwierigkeiten wurde die alkalische Phosphatase-ebenso wie alle anderen Enzyme-in menschlichen Ovarien selten untersucht. Dennoch liegen heute auch darüber eine Reihe von Arbeiten vor. (CORNER 1944, OBER 1950, WHITE et al. 1951, GENESI 1953, ALAMANI und MANGIONE 1956, VERNE 1956, DHOM und MENDE 1956, MILIO 1960, MILIO und CAPRIA 1960, MC KAY et al. 1961, DEANE et al. 1962)

Im Vergleich zu der großen Zahl der Arbeiten über die alkalische Phosphatase im Ovar gibt es bis heute nur wenige Untersuchungen über die sauren Phosphatasen, was dadurch bedingt ist, daß es bis vor wenigen Jahren keine wirklich zuverlässige Methode zum Nachweis der sauren Phosphatasen gab.

Auch hier befaßt sich der größte Teil der Arbeiten mit Ovarien von Tieren. In der ersten diesbezüglichen Veröffentlichung fand YAO 1950 bei Drosophila melanogaster eine positive Reaktion im Follikelepithel der Primärfollikel und in der Granulosa von größeren Follikeln. Außerdem waren die Nährzellen der Oocyten positiv. Nach ARVY 1954 wird bei

niederen Vertebraten ebenfalls ein positives Follikelepithel und eine positive Granulosa gefunden. DELSOL und CHAUX untersuchten 1954 das Ovar der Maus. Zum Nachweis der sauren Phosphatase wurde, wie auch in den obengenannten Arbeiten, die von GOMORI angegebene Technik benutzt. Sie fanden, daß in der Pubertät die saure Phosphatase zuerst in den Thecazellen der Follikel auftritt. Die Ovarien infantiler Mäuse zeigten keine Reaktion.

Mehrere Arbeiten untersuchen das Rattenovar. PERRINI und BOEMI (1953) fanden mit der GOMORI-Technik eine Zunahme der sauren Phosphatase in der Theca interna der Follikel und im Corpus luteum unter der Wirkung von synthetischen Ovarialhormonen. RUTENBURG und SELIGMAN untersuchten mit ihrer Sukzedan-Methode 1955 ebenfalls die Ovarien von Ratten. Sie fanden im Keimepithel eine schwache Reaktion. In kleinen Follikeln war das Plasma der Follikelzellen mäßig positiv. In reiferen und größeren Follikeln war die Reaktion dagegen weniger intensiv. Die Zona pellucida und die Follikelflüssigkeit waren negativ. Die Theca folliculi war stärker gefärbt als die Granulosa. Die stärkste Reaktion zeigte sich aber im Corpus luteum. Das Zytoplasma der Luteinzellen war intensiv granuliert. Nur in dieser Formation des tierischen Organismus waren auch die Kerne angefärbt. Das Bindegewebe zeigte eine mäßige Reaktion. LOBEL, ROSENBAUM und DEANE untersuchten 1961 den Zusammenhang zwischen physiologischer Regression von Follikeln und Corpora lutea und ihrem Enzymgehalt bei Ratten nach der verbesserten Methode von GOMORI 1950. Gesunde Follikel zeigten mit wenigen Ausnahmen keine nachweisbare saure Phosphatase-Aktivität in der Granulosa. Bei den atretischen Follikeln fand sich in dieser Schicht aber eine hohe Aktivität. Die Aktivitätszunahme des Enzyms war unabhängig von der Größe der Follikel. Follikel aller Größen wurden bei Atre-

sie positiv. Mit fortschreitender Atresie nahm auch die Intensität der Reaktion zu, so daß in den späten Stadien der Atresie die einzelnen Granula miteinander zu verschmelzen schienen. Die Eizellen zeigten keinen Enzymgehalt, auch wenn sie völlig von degenerierenden Zellen umgeben waren. Junge Corpora lutea nach der Ovulation zeigten relativ wenig Enzymaktivität. Die Aktivität nahm dann langsam zu und erreichte ihren Höhepunkt bei Corpora lutea vom vorhergehenden Zyklus. Hier war eine stark positive Reaktion in den pericapillären Makrophagen und in den Luteinzellen. Bei noch älteren Corpora lutea nahm die Aktivität dann wieder ab. In Corpora lutea graviditatis während der ganzen Schwangerschaft und Lactation zeigte die saure Phosphatase-Aktivität nur eine mäßig intensive Reaktion.

In einer Arbeit von ARVY 1960 werden die sauren Phosphatasen im Kaninchenovar untersucht. Die Autorin fand in den Follikeln relativ wenig saure Phosphatase. Die Membrana pellucida und die Follikelflüssigkeit waren negativ. Das Zytoplasma der Eizelle und die Granulosa zeigten ebenso wie das Bindegewebe und die Luteinzellen eine große Aktivität. Die Corpora lutea graviditatis wiesen eine intensivere Reaktion als die Corpora lutea menstruationis auf.

Über die saure Phosphatase im menschlichen Ovar liegen nur wenige Untersuchungen vor.

GOLDBERG und JONES haben 1953 erstmals die saure Phosphatase des menschlichen Genitaltraktes untersucht. Sie fanden bei einem pH von 5,6 nach der GOMORI-Methode eine positive Reaktion in Vagina, Endometrium, Tubenmukosa und weniger ausgedehnt im Ovar. Einzelheiten über die Lokalisation im Ovar werden nicht berichtet.

Eine ausführliche Arbeit über die sauren Phosphatasen im menschlichen Ovar veröffentlichten 1961 MC KAY, PINKERTON, HERTIG und DANZIGER. Sie fanden

im Oberflächenepithel keine Enzymaktivität. Im Follikel war ebenfalls keine saure Phosphatase nachzuweisen, bis die Granulosa drei oder mehr Zellschichten breit war. Die Primärfollikel waren negativ. Im Sekundär- und kleineren Tertiärfollikel fand sich saure Phosphatase in der Eizelle, in der Granulosa und in der sich entwickelnden Theca. Im reifen Graaf'schen Follikel war eine saure Phosphatase-Aktivität regelmäßig in der Theca und meist auch in der Granulosa vorhanden. Im atretischen Follikel fand sich eine negative Eizelle und eine leichte bis mäßige Aktivität in der Granulosa. Makrophagen in der Follikelhöhle zeigten eine starke saure Phosphatase-Aktivität. Das Corpus atreticum wies keinerlei Enzym-Aktivität mehr auf. In den Hiluszellen war die saure Phosphatase-Reaktiom positiv. Die saure Phosphatase-Aktivität in Theca und Granulosa des reifen Follikels nahm nach der Ovulation bis zum 18. Zyklustag stark zu. Zu diesem Zeitpunkt war zwischen Theca- und Granulosaluteinzellen kein Unterschied in der Aktivität festzustellen. Die intensive Reaktion des Corpus luteum blieb bis zur Menstruation unverändert erhalten. Auch die Makrophagen im Zentrum waren stark positiv. In der zweiten Woche post menstruationem war die Aktivität des degenerierenden Corpus luteum in allen Luteinzellen noch intensiver als während des Blütestadiums. Die Aktivität nahm dann ab und im Corpus albicans waren nur noch einige saure Phosphatase-positive Makrophagen vorhanden. Im Corpus luteum graviditatis fand sich die saure Phosphatase in der gleichen Verteilung und Menge wie in einem Corpus luteum menstruationis vom 25. Zyklustag.

1962 untersuchten DEANE, LOBEL und ROMNEY die sauren Phosphatasen im menschlichen Ovar. Sie verwendeten Formalin-fixierte Gefrierschnitte nach der GOMORI-Methode. Bei Inkubationszeiten von 20-40 Minuten zeigte sich in gesund aussehenden Follikeln keine Aktivität, nur in atretischen wurde eine Reak-

tion nachgewiesen. Zuerst wurde die Theca interna positiv und später auch die Granulosa. In allen untersuchten Corpora lutea graviditatis lag eine intensive Reaktion vor. Bei einem 6 Wochen alten Gelbkörper war die Enzym-Aktivität vorwiegend in den Luteinzellen in kleinen perinucleären Granula und in einigen Phagocyten lokalisiert. Bei einem 12 wochen alten Corpus luteum graviditatis war die Reaktion noch intensiver. Mit fortschreitender Schwangerschaft wurde die Aktivität noch größer und nahm erst post partum ab, wo die Luteinzellen zunehmend durch Bindegewebe ersetzt wurden.

KÖNIG u.UHSADEL untersuchten 1962 30 menschliche Corpora lutea graviditatis im Alter von 39 bis 75 Tagen post ovul. Zum Nachweis der sauren und alkalischen Phosphatasen wurde die Methode nach MANNHEIMER und SELIGMAN mit Natrium-1-naphthylphosphat, EchtblausalzB und Echtrotsalz TR verwendet. Die Autoren fanden beim Vergleich mit der Metallsalzmethode nach GOMORI keine Unterschiede in der Lokalisation und nur geringe in der Intensität. Auch zwischen der Lokalisation der alkalischen und der sauren Phosphatase waren in den untersuchten Corpora lutea graviditatis keine wesentlichen Differenzen festzustellen. Die saure Phosphatase zeigte allgemein eine weniger intensive Reaktion. Die Gefäße und Kapillaren der Corpora lutea wiesen in der Intima nur alkalische Phosphatase auf. Die Corpora lutea der uterinen Graviditäten reagierten besonders intensiv zwischen dem 50. und 60. Tag post ovul. Nach dem 70. Tag nahm die Intensität der Reaktion ab. Die Gelbkörper vom 39. bis 42. Schwangerschaftstag zeigten nur in der Umgebung der Gefäße eine schwache Aktivität. Bei den Tubargraviditäten fand sich eine intensive Reaktion bei den Fällen mit schon langfristig abgestorbener Schwangerschaft.

Auch KÖNIG und MAHARAJ (1962) fanden bei Corpora

lutea von ungestörten Tubargraviditäten vom 22. Tag der Schwangerschaft an eine positive Phosphatasereaktion, wobei die Aktivität der alkalischen Phosphatase größer war als die der sauren. Bei den kurzfristig gestörten Graviditäten zeigte sich eine schwächere Reaktion als bei den langfristig gestörten.

Tabelle 1: Literaturübersicht über die sauren Phosphatasen im Ovar

Autor	Jahr	Species	Pr.Foll	Sek, Tert.F.		C.l.menstr.		C.l.grav.		Atret.F.		Hilz.	Methode
				Gran	Theca	Gran	Theca	Gran	Theca	Gran	Theca		
YAO	1950	Droso-phila	++	++									Gomori
PERRINI, BOEMI	1953	Ratte			++	+++							Gomori
ARVY	1954	nied. Vertebraten	++	++									Gomori
DELSOL, CHAUX	1954	Maus			+								Gomori
RUTENBURG, SELIGMAN	1955	Ratte	(+)	+	++	+++							Sukzedan methode
ARVY	1960	Kaninchen		++	+	+++		+++					Rabino-vitch
LOBEL, ROSENBAUM, DEANE	1961	Ratte		++		++		++		+++	++		Gomori
MC KAY et al.	1961	Mensch		+	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	?
DEANE, LOBEL, ROMNEY	1962	Mensch				++	++	++	++	+	++		Gomori
KÖNIG, UHSADEL	1962	Mensch						++	++				Manheimer, Seligman
KÖNIG, MAHARAJ	1962	Mensch						++	++				Manheimer, Seligman

5. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) Material und Methodik

Material.

Als Material für die vorliegenden Untersuchungen zum Nachweis der sauren Phosphatasen wurden frische Operationspräparate von Frauen im Alter von 19-65 Jahren verwendet. Alle Patientinnen waren wegen gynäkologischen Erkrankungen operiert worden, wobei die Indikationen nicht durch Funktionsstörungen des Ovars bedingt waren. Eine Ausnahme bilden zwei Fälle mit Keilexcision wegen Verdachts auf Stein-Leventhal-Syndrom.

Es wurden 73 Ovarien von 66 Patientinnen untersucht. In diesen Ovarien fanden sich 32 Corpora lutea menstruationis. Von 14 Graviditäten lagen sechs Corpora lutea aus dem ersten Trimenon der Schwangerschaft, zwei Corpora lutea graviditatis aus dem zweiten Trimenon, fünf vom Ende der Schwangerschaft (bei Sectiones caesareae entnommen) und eines von einer Patientin im Wochenbett vor.

Alle Präparate wurden wenige Minuten nach der Entnahme fixiert.

Fixierung und Einbettung.

Für die Erhaltung der Morphologie und zur Gewinnung dauerhafter Präparate ist die Fixierung des Gewebes, die Einbettung und Schnittherstellung von Bedeutung. Durch die Fixation soll eine Diffusion des Enzyms verhindert werden. Dies geschieht durch eine langsame Eiweißdenaturierung. Die Fixation ist also ein physikochemischer Vorgang, bei dem eine Dehydratation und eine Veränderung der elektrischen Konstanten herbeigeführt wird. (DEANE, BARNETT, SELIGMAN 1960) Die Technik der Fixierung ist wichtig, weil bei den histochemischen Enzymnachweisen nur die strukturgebundenen Desmo-Enzyme erfaßt werden. (GÖSSNER 1958)

Für die Fixation bestehen keine allgemein gültigen Regeln, da jedes Enzym auf diverse Fixierungsmittel un-

terschiedlich reagiert. Die Enzymaktivität wird dabei immer vermindert.

Besonders empfindliche Enzyme müssen oft unfixiert inkubiert werden. Für leicht lösliche Fermente, wie viele Hydrolasen, sind unfixierte Kryostatschnitte ungeeignet, da das Enzym in wäßriger Lösung größtenteils herausgelöst wird (BURSTONE 1958, GOMORI 1950, LOBEL et al. 1961) und dadurch Artefakte entstehen. Außerdem bleiben manche Enzyme in frischem Gewebe aktiv und können Desmo-Enzyme von den Gewebestrukturen, an die sie gebunden sind, ablösen. (GIANETTO und DE DUVE 1955)

Häufig wurde bisher bei Enzymnachweisen die Acetonfixierung und Paraffineinbettung verwendet. Diese Art der Einbettung ergibt gute Schnittpräparate. Für die saure Phosphatase ist diese Vorbehandlung allerdings ungünstig, da der Aktivitätsverlust durch die Erwärmung des Gewebes auf 56-58° bei der Paraffineinbettung (oder mindestens auf 42-44° bei der Einbettung in Weichparaffin), durch die anschließende Entwässerung und Entparaffinierung groß ist. Nach DANIELLI (1953) beträgt der Aktivitätsverlust bei der Einbettung in Hart-Paraffin bis zu 75 %.

Für viele Enzyme ist eine Fixierung in Formalin bei 4°C unter Vermeidung einer Paraffineinbettung günstig. (SELIGMAN et al. 1951) Das Formalin-fixierte Material wird zur Herstellung von Gefrierschnitten verwendet, wobei auch die Strukturdarstellung besser als nach Aceton-Fixierung ist. Nach 24 Stunden Formalin-Fixation findet sich im Gefrierschnitt noch 55 % der sauren Phosphatase-Aktivität, nach 24 Stunden Aceton-Fixierung im Paraffinschnitt nur noch 5-6 %. (SELIGMAN, CHAUNCEY und NACHLAS 1951, PEARSE 1954) GOSSNER (1958) hält die Formalin-Fixierung bezüglich der Erhaltung der Struktur als auch der Enzymaktivität für die beste Art der Vorbehandlung zum Nachweis der sauren Phosphatase.

GOMORI schlug 1941 in seiner Original-Methode Aceton-fixierte Paraffinschnitte vor. Von Nachuntersuchern war später festgestellt worden, daß in Formalin-fixierten Gefrierschnitten ein größerer Teil der Aktivität erhalten bleibt. (SELIGMAN et al. 1951, ERANKÖ 1951, BURTON 1954)

Auch bei der Azofarbstoffmethode waren von verschiedenen Autoren die Aceton-fixierten Paraffinschnitte durch Formalin-fixierte Gefrierschnitte ersetzt worden. (GROGG und PEARSE 1952, PEARSE 1954b) Obwohl BURSTONE (1958) glaubt, daß zum Nachweis der sauren Phosphatase mit Naphthol-AS-Substraten mehrere Jahre gelagerte Paraffinblöcke verwendet werden können, ist heute allgemein der große Aktivitätsverlust von Aceton-fixierten Paraffinschnitten für diesen Enzymnachweis anerkannt. Es werden jetzt von den meisten Untersuchern Formalin-fixierte Gefrierschnitte, gefriergetrocknete Schnitte (BURSTONE 1958, PRATT 1953,1954, EGER und GELLER 1952) oder Kryostatschnitte, die kurz in Formalin nachfixiert werden, verwendet. (ERÄNKÖ 1952, ERÄNKÖ und LEHTO 1954)

Die vorliegende Untersuchung ergab bei Aceton-fixierten Paraffinschnitten unsichere und wechselnde Resultate. In den meisten Schnitten ließ sich mit unseren Methoden keine Aktivität mehr nachweisen. Zur Untersuchung der sauren Phosphatase wurden daher vorwiegend Schnitte, die 12-24 Stunden bei 4°C in neutralem 10 %igem Formalin fixiert worden waren und mit dem Gefriermikrotom 12-14 µ dick geschnitten wurden, verwendet. In einigen Fällen wurden auch Kryostatschnitte angefertigt, die nach dem Schneiden 10 Minuten in 10 %igem Formalin fixiert wurden. Sie lieferten ähnliche Ergebnisse wie die Formalin-fixierten Gefrierschnitte.

Methodik.

Zum Nachweis der sauren Phosphatase wurde die von GROGG und PEARSE 1952 modifizierte Azofarbstoffmethode

nach YIN benutzt. Die Präparate wurden folgendermaßen behandelt:

1) Fixation kleiner Gewebestückchen in 10 %igem Formalin 8-24 Stunden bei 4°C.
2) Aufziehen von 10-15 µ dicken Gefrierschnitten auf Objektträger (ohne Aufklebemittel).
3) Antrocknung (bei +4°C) der Präparate für 1-2 Stunden, um ein Festkleben zu erreichen.
4) Inkubation in der Substratlösung bei Zimmertemperatur (20°C) für 4-10 Stunden.
5) Waschen in fließendem Wasser 1-3 Minuten.
6) Gegenfärben in Mayer's Hämalaun 4-5 Minuten.
7) Waschen in fließendem Wasser 30 Minuten.
8) Eindecken in Diatex.

Herstellung der Substratlösung.

Lösung von 100,0 mg 1-Naphthylphosphat und
200,0 mg Echtblausalz B (o-Dianisidin)
in 200,0 ml Veronal-Acetat-Puffer (Michaelispuffer) von pH 5,0.
Die Lösung wird gut gerührt, zweimal durch ein Faltenfilter filtriert und sofort zur Inkubation verwandt.

In einigen Fällen wurde als Diazoniumsalz das von GÖSSNER (1958) zum Nachweis der sauren Phosphatase besonders empfohlene Echtrotsalz IFR (Diäthyl-sulfamino-o-anisidin) verwendet. Diese Präparate wurden in Eiweiß-Glyceringelee eingedeckt, da der entstandene hellrote Azofarbstoff in Diatex leicht löslich ist. Auch der mit Echtblausalz B (o-Dianisidin) gebildete dunkelrote Azofarbstoff ist wenig in Diatex löslich. Dieser Nachteil wird aber durch luftblasenfreie, dauerhafte Präparate aufgewogen. Die genaue Lokalisierung des Farbstoffes ist dadurch praktisch nicht beeinträchtigt. Die mit Eiweiß-Glyceringelee eingedeckten Präparate enthalten dagegen häufig Luftblasen, die eine Fotodokumentation beeinträchtigen.

Die Inkubationszeit wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben. Sie scheint auch bei verschiedenen Organen, je nach ihrem Gehalt an saurer Phosphatase, zu variieren. In Prostata-Präparaten ist bereits nach wenigen Minuten Inkubation Azofarbstoff zu finden. (PEARSE 1960) Nun ist aber die Prostata das an saurer Phosphatase reichste Gewebe des menschlichen Körpers. BURTON gab 1954 für seine Azofarbstoffmethode Inkubationszeiten von 15 Minuten bis 2 Stunden an. RUTENBURG und SELIGMAN inkubierten mit ihrer Sukzedanmethode 1-2 Stunden und GÖSSNER bei Präparaten von Leber, Milz und Niere ebenfalls 1-2 Stunden. Im Ovar ergab unsere Methode nach einstündiger Inkubation noch keine Reaktion. Die meisten Präparate wurden daher 8-10 Stunden inkubiert. Die Präparate von Corpora lutea graviditatis, die reichlich saure Phosphatase enthalten waren bereits nach 4 Stunden intensiv gefärbt. (Bei 8 stündiger Inkubation wurde die Reaktion so intensiv, daß Einzelheiten infolge der dunklen Färbung kaum mehr zu differenzieren waren.)

Zum Vergleich wurde bei einer Reihe von Präparaten die saure Phosphatase auch nach der verbesserten Metallsalzmethode von GOMORI (1950) nachgewiesen. Die Präparate wurden wie folgt behandelt:

1) Fixation kleiner Gewebestückchen in 10 %igem Formalin 8-24 Stunden bei 4°C.
2) Aufziehen von 10-15 µ dicken Gefrierschnitten auf Objektträger (ohne Aufklebemittel).
3) Lufttrocknung der Präparate (bei 4°C) für 1-2 Stunden, um ein Festkleben zu erreichen.
4) Inkubation bei Zimmertemperatur für 10-11 Stunden in folgender Substratlösung:
   0,01 m Na-ß-Glycerophosphat und 0,004 m Bleinitrat in 0,05 m Acetatpuffer von pH 5.
5) Kurzes Waschen in fließendem Wasser.
6) Einbringen der Schnitte in verdünntes gelbes Ammoniumsulfid (1-2 Minuten).

7) Waschen in fließendem Wasser 1-3 Minuten.
8) Gegenfärben in Mayer's Hämalaun 4-5 Minuten.
9) Waschen in fließendem Wasser 30 Minuten.
10) Eindecken in Diatex.

Die Inkubationszeiten werden in der Literatur für die GOMORI-Technik allgemein länger angegeben als für die Azofarbstoffmethode. ERÄNKÖ inkubierte 1951 2-6 Stunden, GOLDBERG und JONES 1953 bei Präparaten vom menschlichen Genitaltrakt 10 Minuten bis 48 Stunden und DELSOL und CHAUX 1954 Ovarien 4 Stunden.

b) Befunde.

An den Stellen der sauren Phosphatase-Aktivität fand sich bei der Azokupplungs-Methode mit Echtblausalz B ein purpurroter Azofarbstoff, der in stark gefärbten Präparaten beinahe schwarz aussah. Der Farbstoff war über das ganze Zytoplasma der reagierenden Zellen verteilt. In manchen Zellen waren deutlich feine Granula zu sehen, andere schienen homogen angefärbt. In Zellen mit starker saurer Phosphatase-Reaktion waren auch die Kerne angefärbt. Dies ist sicher als Diffusionsartefakt zu deuten, der durch die lange Inkubationszeit, die bei Präparaten vom Ovar erforderlich ist, bedingt sein kann. In Zellen, die nur eine mäßige saure Phosphatase-Aktivität zeigten, wurde keine Kernfärbung beobachtet. Bei langen Inkubationszeiten fand sich in manchen Präparaten eine gleichmäßige leichte Rotfärbung, die wohl als Diffusionsartefakt anzusehen ist, jedoch die Lokalisation der Reaktion und das Fotografieren der Präparate wenig beeinträchtigte.

Beim Nachweis der sauren Phosphatasen mit Echtrotsalz ITR waren die Ergebnisse gleich. Der entstandene Azofarbstoff war heller, mehr orange-rot. Der Niederschlag war fein-granulär und beschränkte sich ebenfalls auf das Zytoplasma. Bei Inkubationszeiten bis 5 Stunden fand sich keine Kernfärbung.

Bei der Metallsalzmethode nach GOMORI ließ sich, übereinstimmend mit der Literatur, die saure Phosphatase vorwiegend in den Kernen nachweisen. Sie waren schwarzbraun angefärbt. Was die Verteilung der sauren Phosphatasen im Ovar anbetrifft, so zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zur Azofarbstoffmethode, was an mehreren Parallelfärbungen von gleichen Präparaten gezeigt werden konnte.

Lokalisation der sauren Phosphatase im Ovar:

Stroma. Im Oberflächenepithel (Keimepithel) konnte keine saure Phosphatase nachgewiesen werden. Die darunter liegende Tunica albuginea zeigte in einigen Fällen eine mäßig positive Reaktion. In Rinde und Mark des Ovars war ebenfalls das Enzym nicht nachzuweisen. Nerven konnten in keinem Präparat dargestellt werden. Die Gefäße des Stromas zeigten keine einheitliche Reaktion. In den meisten Präparaten war in der Intima der Arteriolen eine mäßige Enzym-Aktivität festzustellen. An einigen Stellen hoben sich aber auch die Kapillarwände durch eine rötliche Färbung von der Umgebung ab.
Primärfollikel. In gesund aussehenden Primordial- und Primärfollikeln zeigte sich keine Phosphatase-Reaktion. Die Eizelle und das Follikelepithel waren nicht angefärbt. Nur in einigen atretischen Primordialfollikeln fand sich ein mäßig positives Follikelepithel, das sich deutlich vom umgebenden Ovarialstroma abhob. Die Eizellen hatten einen pyknotischen Kern, Kernreste oder keinen Kern mehr und oft war das Zytoplasma degenerativ verändert. Diese Eizellen zeigten eine schwache Rotfärbung. Bei einigen erreichte die Färbung die gleiche Intensität wie das Follikelepithel.
Sekundär- und Tertiärfollikel. In allen Sekundär- und Tertiärfollikeln, in denen eine Eizelle erhalten war und im Schnitt gefunden wurde, zeigte diese keine Enzym-Aktivität. Im Sekundärfollikel wies die 2-6 Zellschichten dicke Granulosa eine beträchtliche Färbung

auf. Im umgebenden Bindegewebe war keine Reaktion zu sehen. Erst bei dem Tertiärfollikel bekam die sich entwickelnde Theca interna eine mit dem Wachstum des Follikels zunehmende Aktivität. Die Follikelflüssigkeit zeigte in vielen Schnitten einen fein-granulären Farbstoffniederschlag. An manchen Stellen schienen Tröpfchen verschiedener Größe angefärbt zu sein. Auch die nachgewiesenen Call-Exner'schen Körperchen reagierten leicht positiv. Mit dem Wachstum des Follikels nahm die saure Phosphatase-Aktivität in der Theca interna zu und in der Granulosa langsam ab. Kleine Tertiärfollikel reagierten ähnlich wie Sekundärfollikel. Sie zeigten in der Granulosa eine mäßige und in der noch schwach ausgebildeten Theca eine leichte Enzym-Aktivität. Bei reifen Graaf'schen Follikeln und in großen Follikelcysten fand sich die saure Phosphatase vorwiegend in der Theca interna. Die Granulosa zeigte meist nur noch eine schwache Aktivität und war in einigen Präparaten auch ganz negativ.

In Ovarien gravider Frauen bildete bei nahezu allen Follikeln die Theca interna eine breite Zellschicht, die eine bis zu 8 fache Breite der Granulosa aufwies. Diese "Thecaorgane" sind ein charakteristischer Befund in Ovarien schwangerer Frauen, unabhängig vom Alter des Corpus luteum graviditatis. Die breite Theca-interna-Schicht zeigte eine starke saure Phosphatase-Aktivität, während hier die Granulosa in allen untersuchten Fällen keine Reaktion aufwies. Auch in Präparaten von nicht schwangeren Frauen wurden Thecaorgane einige Male gefunden. Es waren hier aber immer einzelne Follikel in der Nähe des Corpus luteum menstruationis, bei denen nur die dem Gelbkörper unmittelbar benachbarte Seite der Theca interna stark verbreitert war.

Atretische Follikel: In atretischen Sekundär- und Bläschenfollikeln fanden sich im Vergleich zu reifenden keine grundsätzlichen Unterschiede in der sauren Phosphata-

se-Aktivität. Die Eizelle oder deren Reste waren, soweit vorhanden, negativ. Die Theca interna ergab eine mittelstarke Reaktion. Die Granulosa war in den meisten Fällen nur noch an einigen Stellen erhalten und wies eine geringere Färbung als die Theca auf. Ihre Aktivität war jedoch stärker als in den nicht atretischen Follikeln. Auch im Bindegewebe zeigte sich keine Reaktion.
Corpora lutea menstruationis. In allen untersuchten Corpora lutea zeigte die saure Phosphatase eine intensive Reaktion, die wesentlich ausgeprägter war als in den Follikeln. Es fanden sich aber deutliche, dem Alter des Corpus luteum entsprechende Unterschiede.

Im eben gesprungenen Follikel und in Gelbkörpern, die einen Tag alt waren, war die Granulosa negativ, während die Thecazellen eine mäßig starke Aktivität aufwiesen. Die Reaktion entsprach so dem Graaf'schen Follikel. In Corpora lutea vom zweiten Tag war das Stigma des Follikels bereits losa durch Blut und Fibringerinnsel verschlossen. Hier lag in Granulosa und Theca eine mäßige saure Phosphatase-Reaktion vor, die jedoch schon intensiver als am ersten Tag war. Am dritten Tag nach der Ovulation war das Corpus luteum bereits stark gefaltet und das Stigma des Follikelsprunges durch loses Bindegewebe verschlossen. Bei cystischen Corpora lutea war in der medianen Höhle ein lockeres Bindegewebe auf dem Luteinzellenband festzustellen. In einem Fall fanden sich in der Höhle massenhaft Erythrocyten. Die Granulosaluteinzellen hatten sich stark vergrößert und waren zu einer dicken Zellschicht geworden. Sie zeigten eine wesentlich stärkere saure Phosphatase-Aktivität als am zweiten Tag. Die Thecazellen waren ebenfalls positiv, jedoch etwas weniger gefärbt als die Granulosaluteinzellen. Am 4. und 5. Tag nahmen Größe und saure Phosphatase-Aktivität der Granulosaluteinzellen weiter zu, während die Aktivität der Thecaluteinzellen nur noch mäßig war. Am 6.-8. Tag nahm die

Reaktion der Thecaluteinzellen noch mehr ab, an manchen inzwischen eingewachsenen Bindegewebssepten wurden Thecaluteinzellen mit ganz schwacher Enzymaktivität nachgewiesen. Die Granulosa war zu diesem Zeitpunkt sehr intensiv gefärbt. Diese starke Reaktion blieb unverändert bis zur Menstruation bestehen. Erst dann nahm die Aktivität in den Granulosaluteinzellen langsam ab, bis am 26.-28. Tag post ovulationem nur noch eine mäßige Aktivität zu finden war. Die Thecaluteinzellen zeigten inzwischen keine Reaktion mehr. Solange im degenerierenden Corpus luteum Granulosaluteinzellen vorhanden waren, zeigten diese auch eine, allerdings immer mehr abnehmende saure Phosphatase-Aktivität. Negative Granulosazellen wurden niemals gesehen. Das eingewachsene Bindegewebe und die Gefäße im Corpus luteum zeigten keine Reaktion. Corpus albicans. Während der Umbildung des Corpus luteum zum Corpus albicans fanden sich am Rande schollenförmige Gebilde mit starker saurer Phosphatase-Aktivität. Makrophagen in der Umgebung des entstehenden Corpus albicans wiesen eine mäßige Reaktion auf, das Bindegewebe war negativ. Die völlig in Corpora albicantia umgewandelten Corpora lutea zeigten keine Aktivität mehr. Corpora lutea graviditatis. Alle untersuchten Corpora lutea graviditatis zeigten eine sehr hohe saure Phosphatase-Aktivität, die noch wesentlich stärker als bei den Corpora lutea menstruationis während des Blütestadiums und zu Beginn der Degeneration war.

Bei mehreren Corpora lutea graviditatis im Alter von 37-42 Tagen post ovulationem war die mächtige Granulosaluteinzellschicht intensiv dunkelrot gefärbt. Die Thecaluteinzellen waren in diesen Präparaten deutlich von den Granulosaluteinzellen zu unterscheiden. Sie waren auch positiv, reagierten aber viel weniger intensiv als die Granulosa. Bei einem Corpus luteum von 94 Tagen p.ov. konnten nur noch geringe Aktivitätsunterschiede festgestellt werden. Die Granulosaluteinzellen

reagierten hier ebenso stark wie bei den jüngeren Corpora lutea. Die intensive saure Phosphatase-Reaktion der Granulosa blieb unverändert bis zum Ende der Schwangerschaft bestenen. In zwei Fällen fand sich in Corpora lutea vom 5.-6. Monat der Gravidität eine gleich starke Reaktion in allen Luteinzellen. Auch in vier Corpora lutea graviditatis, die bei Sectiones entnommen worden waren, konnte eine gleichmäßig starke saure Phosphatase-Aktivität aller Luteinzellen nachgewiesen werden. Bei einem Corpus luteum, das sechs Wochen post partum von einer Patientin im Wochenbett entnommen wurde und zu diesem Zeitpunkt etwa 290 Tage alt war, befanden sich die Luteinzellen schon in Auflösung. Die Kerne waren pyknotisch, die Zellen stark wabig und zwischen den Zellen fanden sich Vakuolen. In diesem Corpus luteum zeigte sich nur eine schwache, nicht ganz gleichmäßige Reaktion der Luteinzellen.

In allen untersuchten Corpora lutea graviditatis waren Bindegewebe und Gefäße ohne histochemisch erfaßbare Enzym-Aktivität.

Hiluszellen. Hiluszellen wurden nur in einem Präparat bei einer 50 jährigen, nicht mehr regelmäßig menstruierten Patientin gefunden. Mehrere Zellnester großer epitheloider Zellen hoben sich durch eine dunklere Färbung infolge schwacher Phosphatase-Aktivität vom umgebenden Gewebe ab.

B. LIPASEN-ESTERASEN

1. Biochemie der Lipasen-Esterasen

Unter Esterasen werden im allgemeinen Carboxylsäure-Esterasen verstanden, die, ebenso wie die im vorhergehenden Teil besprochenen Phosphatasen in die große Gruppe der Hydrolasen gehören. Sie hydrolysieren die Ester der Carboxylsäuren, wobei je nach der Art des Alkohol- und Säurerestes verschiedene Typen unterschieden werden können.

Zu den gruppenspezifischen Carboxylsäureesterasen mit geringer Substratspezifität gehören die in der Literatur meist als "Esterasen im engeren Sinne" bezeichneten Fermente und die Lipasen. Daneben gibt es eine große Zahl von relativ spezifischen Carboxylsäure-Esterasen wie die Cholinesterasen, Acetylcholinesterasen, Cholesterinesterasen, Phospholipasen, Chlorophyllasen u.a.

Zwischen Esterasen im engeren Sinne und Lipasen ist die Unterscheidung oft schwierig, da beide Fermente sowohl Ester einwertiger Alkohole und Phenole als auch Glycerinester spalten können. Die Unterschiede sind mehr quantitativer Natur. Doch hat LOEVENHART schon 1906 gefunden, daß eine gewisse Unterscheidung zwischen Leber-Esterase und Pankreas-Lipase durch Bevorzugung verschiedener Substrate und unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Hemmstoffe möglich ist.

Die unspezifischen Esterasen (Esterasen im engeren Sinne) werden von vielen Autoren auch Aliesterasen genannt. RICHTER und CROFT haben diese Bezeichnung 1942 für Esterasen, die einfache aliphatische Ester oder Stickstoff-freie Alkohole hydrolysieren, vorgeschlagen. Der Name hat sich für die unspezifischen Esterasen eingebürgert, obwohl inzwischen erkannt wurde, daß manche von ihnen auch Stickstoff-haltige Substrate spalten.

Die unspezifischen Esterasen werden in allen Gewe-

ben des tierischen Organismus gefunden. Eingehend sind sie in der Leber untersucht worden. Einfache Ester organischer Säuren mit einwertigen Alkonolen werden wesentlich schneller hydrolysiert als Fette und andere Glycerinester. Die unspezifischen Esterasen greifen vorwiegend kurze Ketten an, Triglyceride mit weniger als 5 C-Atomen und Monoester mit höchstens 11 C-Atomen. Das pH-Optimum der Leber-Esterase liegt zwischen 7,8 und 8,8. Für dieses Ferment sind viele Inhibitoren und Aktivatoren bekannt. Eine hemmende Wirkung haben z.B. Coffein, Nicotin, Pilocarpin, Adrenalin, Thyroxin, gallensaure Salze (besonders Na-Taurocholat), Calciumoleat (HOFFMANN-OSTENHOF 1954), außerdem Fluorid und Arsenilat (NACHLAS und SELIGMAN 1949b). Ein weiterer wirksamer Inhibitor wurde 1931 von STEDMAN und STEDMAN im Hydrochlorid des m-Dimethylaminophenylester der Methylcarbaminsäure gefunden.

Eine weitere Klassifikation der verschiedenen Esterasen ist sehr schwierig, da sich die Enzyme in der Aktivität und den angegriffenen Substraten zum Teil überschneiden. Nach den Ergebnissen seiner histochemischen Untersuchungen teilte GOMORI (1952b) die Esterasen in Lipase, Esterase, α-Esterase und Cholinesterase ein. Später (1955) unterschied er auf Grund seiner Untersuchungen an menschlichen Geweben drei Typen von Esterasen:

a) Typ der Leberesterasen. Sie werden durch DFP (Di-iso-propyl-fluorophosphat) und E 600 (Diäthyl-nitrophenyl-phosphat) gehemmt.

b) Typ der Pankreasesterasen. Hemmstoffe sind DFP und E 600. Diese Esterasen werden durch Laurylsulfat aktiviert und sind unempfindlich gegen Fluorid.

c) Allgemeiner Typ. Diese Art kommt in Magen, Niere und vielen anderen Organen vor. Sie ist unempfindlich gegen Fluorid, DFP, E 600.

PEARSE (1960) nanm eine Einteilung in A-, B- und C-

Esterasen vor, die auch durch verschiedene Hemmstoffe gegen einander abgegrenzt werden.

Eine genaue Unterscheidung zwischen Lipasen und Esterasen ist sehr schwer. Es besteht aber kein Zweifel, daß die Lipasen selbständige Fermente sind. HANRIOT hatte zum ersten Mal 1896 ein Monobutyrin-spaltendes Enzym des Blutes als Lipase bezeichnet. Später wurde gezeigt, daß diese Bezeichnung falsch war, da das beschriebene Ferment im Serum kein Fett, sondern nur einfache Ester niederer Fettsäuren hydrolysiert. Heute sind eine Reihe von spezifischen Eigenschaften der Lipasen bekannt. Sie kommen vorwiegend im Pankreas vor. Das pH-Optimum der Pankreas-Lipase liegt bei pH 9. Die bei manchen Spezies in der Magenschleimhaut gefundene Lipase hat dagegen ein pH-Optimum bei 6. Diese Unterschiede sind wahrscheinlich durch Verunreinigungen bedingt; denn nach gründlicher Reinigung der Fermente ändert sich das pH-Optimum bis zu einem konstanten Wert um pH 7,5-8,0.

Der Name Lipase berechtigt nicht zu der Annahme, daß die Substrate dieses Enzyms ausschließlich Fette, also Triglyceride höherer Fettsäuren seien. Die Lipase spaltet allgemein langkettige und verzweigte Ester, sowohl Triglyceride als auch Monoester. Bei Triglyceriden müssen die Säureketten mindestens 5 C-Atome enthalten, bei Monoestern wenigstens 12 C-Atome. Die Lipasen spalten also Ester, die im allgemeinen von den Esterasen nicht mehr angegriffen werden. Die Substrate der Esterasen werden allerdings auch oft von den Lipasen hydrolysiert.

Für die Lipasen sind ebenfalls Aktivatoren und Inhibitoren bekannt. Durch Natrium-Taurocholat und noch mehr durch Natrium-Desoxycholat (DE MOERLOOSE 1961) wird die Reaktion im Pankreas aktiviert. Chinin hemmt die Pankreas-Lipase, nicht aber die Leber-Esterase, während Atoxyl, Natrium-Arsenilat und Natrium-Lauryl-

sulfat eine umgekehrte Wirkung haben. (NACHLAS und SELIGMAN 1949b, GOMORI 1955) Natrium-Fluorid hat auf das Pankreasenzym wenig Einfluß, ist aber ein wirksamer Hemmstoff für Leber- und Nieren-Esterasen.

Außer im Pankreas und in der Magen- und Darmschleimhaut finden sich Lipase-artige Fermente in geringen Spuren in vielen anderen Organen (Lunge, Niere, Nebenniere, Placenta u.a.) Bis jetzt ist allerdings noch nicht sicher erwiesen, ob nicht einige dieser Fermente doch zum Typ der unspezifischen Esterasen gehören.

2. Funktion der Lipasen-Esterasen im Stoffwechsel

Nach DE DUVE (1959) ist bisher nur in Ausnahmefällen die Funktion der Hydrolasen näher bekannt, wie z.B. bei Glucose-6-phosphatase und bei den Cholinesterasen. Für die Frage, ob die Esterasen nur hydrolysieren oder auch eine Transferase- oder Synthesefähigkeit besitzen, gelten die entsprechenden Ausführungen über die Phosphatasen. Diese Eigenschaften liegen wahrscheinlich bei allen Hydrolasen vor. So wird heute angenommen, daß auch die Esterasen meistens echte Hydrolysen, gelegentlich Transferrierungen und selten Synthesen katalysieren.

Die von den Hydrolasen ausgeführten Reaktionen sind obligatorische Stufen bei vielen Stoffwechselvorgängen, wie die Wirkung von Glucose-6-phosphatase bei der Glucoseproduktion oder die der Lipase beim Fettabbau im Fettstoffwechsel. Die am Stoffwechsel beteiligten Hydrolasen sind entweder in der löslichen Fraktion der Zelle oder wie die Esterasen in den Mikrosomen lokalisiert. (DE DUVE 1959)

Die Lipase des Pankreas ist ein extrazelluläres Sekretions-Enzym. Sie spaltet die mit der Nahrung aufgenommenen Neutralfette teilweise in ihre Bestandteile, da sie sonst nicht von der Darmwand resorbiert werden können. Als Spaltprodukte entstehen dabei vorwiegend

Mono- und Diglyceride. Da die Pankreas-Lipase besonders die 1- und 3-Esterbindungen von Triglyceriden höherer Fettsäuren angreift, werden hauptsächlich 2-Monoglyceride gebildet. (HOFFMANN-OSTENHOF 1954) Die im Pankreas erzeugte Lipase wird zum großen Teil in den Darm sezerniert. Ein geringer Prozentsatz gelangt ins Blut und wird mit dem Harn ausgeschieden. (RICHTERICH 1958)

Die Funktion der intrazellulären unspezifischen Esterasen ist bis jetzt noch ziemlich unbekannt. Möglicherweise mobilisieren sie bei Bedarf die Fettreserven der Zelle zur Speisung des Energiestoffwechsels. (HOFFMANN-OSTENHOF 1954). VERNE (1956) glaubt, daß die Esterasen bei Absorptions- und Transitprozessen wohl nicht mitwirken, sondern bei Stoffsynthesen, bei denen Fettsäureester beteiligt sind (wie in Leber-, Darm-, Nieren- und Alveolarzellen) und bei der Hormonbildung (in Hoden, Corpus luteum, Schilddrüsenepithel).

Die Lokalisation in den Mikrosomen läßt eine Beteiligung der Esterasen bei allen diesen Zellbestandteilen zugeschriebenen Stoffwechselleistungen wie Stoffaufnahme, Stoffabgabe, intrazellulärer Stofftransport und vor allem Proteinsynthese (LEUTHARDT 1959) vermuten.

Auch über die physiologischen Substrate der mit Naphthol-Derivaten nachgewiesenen unspezifischen Esterasen liegen bis heute keine sicheren Kenntnisse vor.

3. Histochemie der Lipasen-Esterasen

Wie für alle Hydrolasen gelten die bei den Phosphatasen beschriebenen drei Nachweismethoden grundsätzlich auch für die Lipasen-Esterasen.

a) Metallsalzmethode

Als Substrate für den Nachweis der Lipasen-Esterasen bei neutralem pH werden heute vorwiegend die sogenannten "TWEENS" benützt. GOMORI hatte 1945, auf der Suche nach einem Substrat für den Nachweis der Lipase, viele Fettsäurederivate untersucht und die besten Ergebnisse mit den Tweens erzielt. Es handelt sich hierbei um langkettige (C_{12}-C_{18}) Fettsäureester von Sorbit oder Mannit, in denen die verbleibenden Hydroxylgruppen mit Äthylenoxydketten verätherт sind. Diese bernsteinfarbigen Verbindungen haben eine ölige Konsistenz, sind aber mit Wasser in jedem Verhältnis mischbar. Bei der von GOMORI angegebenen Methode reagieren die an der Stelle der Fermentaktivität freiwerdenden Fettsäuren mit dem Inkubationsmedium zugesetzten Kalziumionen und bilden unlösliche Kalziumseifen. Diese werden über Bleiseifen in schwarz-braunes Bleisulfid überführt. GOMORI hat später (1946, 1949, 1952) seine Methode verbessert. Auch von anderer Seite sind verschiedene Modifikationen vorgeschlagen worden. WACHSSTEIN (1946) ersetzte den Maleatpuffer durch einen Michaelispuffer. Von SNEATH (1950) und MARK (1950) wurden Bicarbonat- und Veronalpuffer statt des von GOMORI in seiner Modifikation angegebenen Trispuffer empfohlen. RICHTERICH (1952) verwendete ein etwas anderes Inkubationsmedium, inkubierte bei 45°C und erprobte Aceton als bestes Fixierungsmittel. Das von GOMORI im Inkubationsmedium verwandte Glycerin hält er für ungeeignet, da es die Lipasen extrahiere. Er erzielte mit Gefrierschnitten bessere Resultate als mit Paraffinschnitten. MARTIN empfahl 1953, die Präparate in Glycerin-Gelatine einzudecken, um ein

Ausbleichen des Bleisulfids zu vermindern.

Trotz der Verbesserungsvorschläge sind die Ergebnisse der Tween-Methoden nicht ganz zufriedenstellend, was zum Teil auf dem spontanen Abbau und dem langsamen Eindringen des Tweens in das Gewebe beruht. Mit der Methode werden auch nur ziemlich grobe Ergebnisse erzielt, die eine genauere Lokalisation des Enzyms nicht ermöglichen. (SHNITKA und SELIGMAN 1961) Dazu kommen eine Reihe von methodischen Schwierigkeiten. So weist RICHTERICH (1952) darauf hin, daß die von GOMORI angegebenen Resultate von verschiedenen Autoren nicht wieder reproduziert werden konnten. Auch von PEARSE (1960) wird die Tween-Reaktion nicht als Routine-Methode empfohlen, da sich das Bleisulfid in den Präparaten in größeren Schollen niederschlägt und dadurch eine genaue Lokalisation kaum möglich ist.

Ursprünglich hatte GOMORI die Tweens als Substrate für Lipasen angesehen. Bald wurde aber erkannt, daß die meisten Tweens auch von Esterasen gespalten werden. (NACHLAS und SELIGMAN 1949b, RICHTERICH 1952) Besonders Tween 40 und 60 sollen ebenso gut von Esterasen angegriffen werden, während GOMORI Tween 80 als spezifisches Substrat für Lipasen ansieht. 1949 untersuchte er mit seiner Methode 25 wasserlösliche Fettsäureester. Alle gaben eine positive Reaktion, deren Intensität aber beträchtlich variierte. Stearate reagierten intensiver als Laurate und Palmitate. Große Unterschiede ergaben sich zwischen den Estern gesättigter und ungesättigter Fettsäuren. Mit wasserlöslichen ungesättigten Fettsäureestern erzielte GOMORI nur im Pankreas und bei manchen Species in der Magenschleimhaut positive Resultate. Ähnliche Ester gesättigter Fettsäuren wurden von Esterasen im Pankreas, der Leber und vielen anderen Organen angegriffen. Daher nahm GOMORI an, daß mit ungesättigten Tweens nur Lipase nachgewiesen wird, während die gesättigten auch durch unspezifische Esterasen gespalten werden.

b) Azofarbstoffmethoden

Die erste Azofarbstoffmethode zum Nachweis der unspezifischen Esterase wurde 1949 von NACHLAS und SELIGMAN entwickelt. Als Substrat verwendeten sie 2-Naphthylacetat, das nach der enzymatischen Hydrolyse mit dem Diazoniumsalz aus 1-Naphthylamin und Naphtalin-1,5-disulfonsäure kuppelte. Von GOMORI wurde 1950 das 1-Naphthylacetat empfohlen, das wesentlich langsamer hydrolysiert wird als das 2-Isomere. (RAVIN und SELIGMAN 1953) Durch die geringere Hydrolysegeschwindigkeit, die nur 76 % der des 2-Naphthylacetates beträgt, wurde eine schärfere Lokalisation des Enzyms erreicht. Da der aus 1-Naphthol gebildete Azofarbstoff fest an Protein gebunden wird (RUTENBURG und SELIGMAN 1956), ist auch die Gefahr der Diffusion geringer. Die aus 2-Naphthol entstehenden Azofarbstoffe haben zudem die Neigung, vor der Präzipitation für kurze Zeit in kolloidaler Lösung zu bleiben. Dadurch entstehen oft beträchtliche Artefakte. (GOMORI 1952b, GÖSSNER 1958). Mit der von GOMORI angegebenen Methode wurden sehr gute Erfolge erzielt. BURTON schlug 1954 die Verminderung der Diazoniumsalzkonzentration auf 0,2-0,4 mg/ml vor, da sonst eine Fermenthemmung zu befürchten sei. Außerdem empfahl er als Reaktionsbeschleuniger "Percain".

Da bei den einfachen Naphthol-Substraten immer die Gefahr einer Diffusion besteht, wurden von verschiedenen Autoren substituierte Naphthole vorgeschlagen. GOMORI verwendete 1952 1-Naphthylbenzoat und erzielte damit ähnliche Ergebnisse wie mit Acetat. Von ihm wurde auch das Naphthol-AS-Acetat (2-Acetoxy-3-naphthoylanilid) eingeführt. Dieses Substrat wird noch langsamer als 1-Naphthylacetat hydrolysiert und kuppelt auch langsamer. Vor der Kupplung diffundiert es weniger als die beiden einfachen Naphthole vom Ort der Freisetzung ins Gewebe. (PEARSE 1960) Leider ist das Substrat in Wasser schlecht löslich, so daß Propylenglykol als Lö-

sungsvermittler zugegeben werden muß. Von PEARSE wurde 1954 das von GOMORI vorgeschlagene Naphthol-AS-Acetat untersucht und die Methode modifiziert, um das Substrat besser in Lösung zu bringen. Verschiedene andere Autoren erzielten mit Naphthol-AS-Acetat ebenfalls gute Resultate. (CHESSICK 1955a,b, GOMORI und CHESSICK 1953, MALATY und BOURNE 1954, PEARSON und DEFENDI 1957)

Mit noch unlöslicheren Naphtholderivaten sahen PEARSE (1954b) mit Naphthol-AS-OT-Acetat (2-Acetoxy-3-naphthoyl-o-toluidin), BURSTONE (1957) mit Naphthol-AS-BI-, Naphthol-AS-TR-, Naphthol-AS-MX- und GOSSNER (1958) mit Naphthol-AS-D-Acetat gute Ergebnisse.

GOMORI hat 1952(a) für seine Methode mit 1-Naphthylacetat als Diazoniumsalz Echtblausalz RR (4-Benzoylamin-2,5-dimethoxyanilin) und Echtrotsalz RC (4-chlor-2-amino-anisol) vorgeschlagen. PEARSE empfahl 1953 Echtblausalz B. 1957 führten NACHLAS und SELIGMAN für die Methode mit Naphthol-AS dieses Salz in hoher Konzentration (4mg/ml) ein, um die Geschwindigkeit der Kupplungsreaktion zu beschleunigen. GOSSNER verwendete 1958 für diese Methode mit gutem Erfolg Echtblausalz B und Echtgranatsalz GBC (o-amino-azotoluol). PEARSE empfahl 1960 Echtrotsalz RC, Echtrotsalz TR (5-chlor-o-toluidin) und ebenfalls Echtgranatsalz GBC.

Ob das Naphthylacetat und das Naphthol-AS-Acetat von den gleichen Esterasen hydrolysiert wird, ist von mehreren Untersuchern sehr unterschiedlich beantwortet worden und steht heute noch nicht endgültig fest. PEARSE (1954a), MALATY und BOURNE (1954) und PEARSON und DEFENDI (1957) stellten in verschiedenen Organen ganz ähnliche Ergebnisse mit beiden Substraten fest. CHESSICK fand 1953 (b), daß die Methoden teilweise die gleichen Resultate geben, zum Teil aber auch große Unterschiede bestehen. (Esterase-Spektrum) Wahrscheinlich sei es falsch anzunehmen, daß die Ergebnisse mit Naphthylacetat und Naphthol-AS-Acetat identisch seien. Naphthol-AS-Acetat hat eine Carbonylgruppe mehr und jede

ungesättigte Gruppe erhöht die Reaktionsfähigkeit, was durch die Unterschiede in der Lokalisation der Fermentaktivität bestätigt werde. (CHESSICK 1953a) Auch GOMORI und CHESSICK glaubten 1953, daß das Naphthol-AS-Acetat zum Teil noch durch ein anderes Enzym gespalten wird, obwohl die Ergebnisse in vielen Geweben nahezu identisch sind. GOMORI (1952b) vermutete sogar die Existenz einer spezifischen Naphthol-AS-Esterase. PEARSE (1960) hielt allerdings die Beweise für die Existenz eines solchen Enzyms für unzureichend. Naphthylacetat und Naphthol-AS-Acetat werden sowohl von den gruppenspezifischen wie auch von den spezifischen Carbonsäureesterasen und sogar von manchen proteolytischen Enzymen gespalten. GÖSSNER (1958) konnte zeigen, daß Naphthol-AS-Acetat von bestimmten Peptidasen wie Trypsin und Chymotrypsin hydrolysiert wird.

c) Indoxylmethode

Unabhängig voneinander wurde von BARNETT und SELIGMAN (1951,1952) sowie von HOLT (1952) eine Indoxylmethode zum Nachweis der unspezifischen Esterasen eingeführt. Als Substrate verwendeten sie Indoxylacetat und -butyrat. Die Esterasen hydrolysieren die Indoxyl-Ester von Carbonsäuren und setzen Indoxyl frei, das bei alkalischem pH sofort durch Luftsauerstoff in unlösliches blaues Indigo überführt wird. Bei neutralem pH verläuft die spontane Oxydation sehr langsam. HOLT und Mitarbeiter (HOLT 1954, 1956, 1958, COTSON und HOLT 1958, HOLT und WITHERS 1952) zeigten aber, daß eine genaue intrazelluläre Lokalisation der Esterase mit der Indoxyl-Methode möglich ist. Sie gaben auch mehrere Verbesserungen ihrer ursprünglichen Methode an. So verwendeten sie in kaltem Kalzium-Formalin fixierte freischwimmende Gefrierschnitte, halogen-substituierte Indoxylester wie 5-Bromo-indoxyl-acetat, 5-Bromo-4-chloroindoxyl-acetat und Ferro-ferricyanid als Oxydationsbeschleuniger.

d) Inhibitoren

In seinen ersten grundlegenden Arbeiten versuchte GOMORI, durch spezifische Inhibitoren die Lipasen von den Esterasen zu unterscheiden und sie gegen die Cholinesterasen abzugrenzen. Auch von anderen Autoren wurden später verschiedene Hemmstoffe untersucht.

GOMORI fand, daß die Tween-Reaktion in den vermutlich Esterase enthaltenden Präparaten durch Natrium-Taurocholat ($2x10^{-3}$mol) stark gehemmt wurde, während ein Zusatz von 0,005 m Taurocholat die Reaktion im Pankreas intensivierte. Nach MINARD (1953) liegt eine Inhibition der Aktivität der Pankreaslipase durch Tween vor, die durch Taurocholat wieder aufgehoben wird. Eine Aktivierung der Pankreas-Lipase wurde auch durch Aminosäuren, Peptide, Albumin und Kalzium-Oleat erreicht. (WILLSTÄTTER und MEMMEN 1924) Unterschiede zwischen unspezifischen Esterasen und Lipasen zeigten sich auch bei der Behandlung der Präparate mit Atoxyl ($2x10^{-4}$mol) und Natrium-Arsenilat (10^{-1}mol), die beide die Esterasen wesentlich stärker hemmen als die Lipase. Umgekehrt verhält sich Chinin (0,1 mol). In seiner ersten Veröffentlichung gab GOMORI (1945) eine Hemmung der Lipase durch Vorbehandlung der Schnitte mit Lugol'scher Lösung, 5 %igem Phenol oder kochendem Wasser (10 Minuten) an. Eine Inhibition der unspezifischen Esterasen wurde mit Natrium-Fluorid ($2x10^{-3}$-$2x10^{-2}$ mol), Phemerol ($2x10^{-3}$mol), DFP (Di-iso-propyl-fluorophosphat 10^{-5}mol) und Eserin gefunden. (GOMORI und CHESSICK 1953) 1-Naphthylacetat-Esterase wurde durch eine Konzentration von 10^{-5}mol Eserin und Naphthol-AS-Acetat-Esterase durch 10^{-4}mol vollständig gehemmt. (CHESSICK 1953a) weitere Hemmstoffe für Esterasen sind Prostigmin (10^{-5}-10^{-4}mol), das auch, ebenso wie Eserin, eine starke Wirkung auf die Cholinesterasen hat, außerdem E 600 (Diäthyl-nitrophenyl-phosphat)(10^{-6}mol) und das von STEDMAN und STEDMAN 1931 gefundene Hydrochlorid des m-Dimethyl-amino-phenylesters des Methylcarbaminsäure.

Tabelle 2

Differenzierung zwischen Lipase (Pankreas) und Esterase (Leber)

(nach NACHLAS und SELIGMAN 1949b, GOMORI 1949, 1955, AMMON und DIRSCHERL 1959, DEANE et al. 1961)

1) Hydrolyse verschiedener Substrate

Substrat	Lipase	Esterase
Tributyrin	+++	+
Methylbutyrat	+	+++
gesättigte Fettsäureester	++	++
unges. Fettsäureester	++	Θ
gestreckte Ketten	+++	+
verzweigte Ketten	+	+++
Ester mit langen Ketten (Triglyceride > 5 C-Atome, Monoester > 12 C-Atome)	++	(+)
Ester mit kurzen Ketten (Triglyceride < 5 C-Atome Monoester < 12 C-Atome)	++	++

+++ = gut gespalten, + = schlecht gespalten
Θ = nicht gespalten

2) Wirkung von Effektoren

Effektor	Lipase	Esterase
Na-Taurocholat	aktiviert	gehemmt
Na-Arsenilat	unbeeinflußt	gehemmt
Atoxyl	unbeeinflußt	gehemmt
Na-Fluorid	kaum gehemmt	stark gehemmt
Chinin	gehemmt	unbeeinflußt
Leu-gly-gly-	aktiviert	unbeeinflußt
Polypeptide	aktiviert	unbeeinflußt
Albumin	aktiviert	unbeeinflußt
Ca-Oleat	aktiviert	unbeeinflußt
Lauryl-sulfat	aktiviert	gehemmt
Eserin, Prostigmin	gehemmt	gehemmt

e) Lokalisation

Über die intrazelluläre Lokalisation der Esterasen wurden erst in den letzten Jahren eingehendere Kenntnisse gewonnen. Ursprünglich wurde ein Vorkommen von Esterase in den Mitochondrien angenommen.

Mehrere Autoren differenzierten mit histochemischen Untersuchungen die Lokalisation der Esterasen in der Zelle. So wiesen HOLT und WITHERS (1952) mit ihrer Indoxylmethode das Enzym in unregelmäßigen, runden Partikeln verschiedener Größe (0,5-3 µ), in Leberzellen am basalen Zellrand entlang den Gallengängen nach. Auch in der Gegend des Golgi-Apparates wurde eine Anhäufung beobachtet. BURSTONE (1957) fand Esterase in runden Tröpfchen in der Nähe des Kernes und im basalen Zytoplasma von Nierentubuli, was PEARSE (1954a) mit Naphthol-AS-Acetat und GOSSNER (1958) mit Naphthol-AS-D-Acetat bestätigten.

Mit biochemischen Methoden zeigten LUDEWIG und CHANUTIN 1950, daß sich die Esterase im Homogenat der Rattenleber nur zu 6,5 % in den Kernen und größtenteils in einer Fraktion von kleinen zytoplasmatischen Partikeln nachweisen läßt. Der Anteil der Kernfraktion liegt dabei innerhalb der Fehlergrenze der Methode. DE DUVE und BERTHET (1954) stellten bei fraktionierter Zentrifugierung im Leberhomogenat die meisten Hydrolasen nicht frei im Zytoplasma, sondern an Partikel gebunden fest. Nach diesen Untersuchungen ist die Esterase in den Mikrosomen lokalisiert. Auch andere Autoren fanden im Leberhomogenat eine Sedimentierung der Esterase in der Fraktion der Mikrosomen. (OMACHI et al. 1948, NOVIKOFF et al. 1953, UNDERHAY et al. 1956, KRISHNAMURTHY et al. 1958, MARKERT und HUNTER 1959, DE DUVE 1959) Da die Mikrosomen aber hauptsächlich aus Bruchstücken des endoplasmatischen Retikulums und aus PALADE-Körnern bestehen, würde ein solches Vorkommen für eine diffuse Verteilung der Esterase im Zytoplasma sprechen. (SHNITKA

und SELIGMAN 1961) HOLT (1958b) stellte eine Diskrepanz zwischen seinen, mit histochemischen Methoden gewonnenen Ergebnissen und den Befunden anderer Autoren im Leberhomogenat fest, und nahm an, daß das Enzym in der intakten Zelle an Granula in der Nähe der Gallengänge gebunden ist und bei der Homogenisierung von seinem natürlichen Sitz entfernt und an Mikrosomen absorbiert wird. SHNITKA und SELIGMAN wiesen 1961 nach, daß die erwähnte Diskrepanz durch eine Hemmung der Esterase im Zytoplasma zustande kommt und HOLT mit seiner Methode nur eine gegen die verwendeten Hemmstoffe resistente Esterase in den Granula nachgewiesen hatte. An der ausschließlichen Lokalisation der Esterase in den Mikrosomen ist heute wohl nicht mehr zu zweifeln. Ein beträchtlicher Teil der Esterasen scheint in löslicher Form vorzuliegen und kann leicht aus dem Gewebe ausgewaschen werden. (DOYLE und LIEBELT 1954) In einer Arbeit von OGAWA et al. (1961) wurde ein Vorkommen von Tween 80 spaltender Esterase (nach GOMORI wohl eine Lipase) in den Lysosomen vermutet. Dieser Befund steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren, die in den Lysosomen nur Enzyme mit saurem pH-Optimum nachweisen konnten. (DE DUVE 1959, NOVIKOFF 1959, LOBEL et al. 1960) Für die Lipase wurde eine von der unspezifischen Esterase abweichende Lokalisation in der Literatur nicht beschrieben.

4. LIPASEN-ESTERASEN IM OVAR

Über die Esterasen im Ovar liegen zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Substraten und bei verschiedenen Species vor.

Das Vorkommen von unspezifischen Esterasen im Eierstock der weißen Ratte untersuchte BARNETT (1952a,b) mit seiner Indoxylmethode, DEANE (1952) nach der Methode von NACHLAS und SELIGMAN (1949) und HUNTER und KNEISKE (1957) nach der GOMORI-Methode mit 1-Napnthyl-butyrat. Im Ovar des Kaninchens wies ARVY (1960) die 1-Naphthyl-Acetat-Esterase nach.

Eine Untersuchung der unspezifischen Esterase im menschlichen Eierstock mit 1-Naphthyl-Acetat beschrieb JIRÁSEK 1961. Er fand im Primärfollikel eine schwach positive Eizelle, im Sekundär- und Tertiärfollikel eine starke Reaktion in der Granulosa und im Graaf´schen Follikel eine positive Granulosa und Theca. Auch im atretischen Follikel zeigte die Granulosa und besonders die Theca eine Esterase-Aktivität. Im Corpus luteum war die Granulosa stark angefärbt, auch die Thecaluteinzellen waren positiv.

In einer Arbeit von MC KAY et al. (1961) wurde unspezifische Esterase in Spuren in der Theca interna von Tertiärfollikeln, in Makrophagen, in atretischen Follikeln, in Hiluszellen und im Corpus luteum des menschlichen Ovars gefunden. Der Primärfollikel, die Eizelle und die Granulosa des Tertiärfollikels zeigten keine Reaktion. Im Corpus luteum wiesen die Thecaluteinzellen eine größere Aktivität auf als die Granulosaluteinzellen. Vom 18. Tag p.m. an war die Enzym-Aktivität im Corpus luteum ungefähr konstant. Auch im degenerierenden Gelbkörper war noch eine mäßige Esterase-Aktivität vorhanden. Im Corpus albicans zeigten sich einige Enzym-haltige Makrophagen, sonst war es negativ. Im Corpus luteum graviditatis fand sich die unspezifische Esterase in der gleichen Intensität und Verteilung wie im Corpus luteum menstruationis vom 25.

Zyklustag. Die Autoren bemerkten eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse im menschlichen Eierstock und im Rattenovar. Die Substrate und Methoden der Untersuchungen wurden in der Arbeit nicht angegeben.

Über ein Vorkommen von Naphthol-AS-Acetat-Esterase im Ovar gibt es nur wenige Arbeiten. MALATY und BOURNE (1954) fanden im Eierstock von Frau und Maus mit Naphthol-AS-Acetat und Naphthyl-Acetat keine Aktivität. CHESSICK (1953b) untersuchte verschiedene Gewebe mit den gleichen Substraten. Die höchste Aktivität stellte er in Leber, Pankreas und Niere fest. Im menschlichen Eierstock und im Mäuseovar zeigte sich keine Reaktion. Das Kaninchenovar wies eine große Aktivität auf, ebenso das Follikelepithel im Eierstock der Katze. Bei der Ratte fand sich in den Epithelien der Graaf´schen Follikel eine 1-Naphthyl-Acetat- und Naphthol-AS-Acetat-Esterase, wobei das 1-Naphthylacetat viel schneller hydrolysiert wurde als das Naphthol-AS-Acetat.

Mit Tween-Estern als Substraten wurden Lipasen-Esterasen im Ovar von verschiedenen Autoren nachgewiesen. Seit GOMORI´s Untersuchungen 1945 ist bekannt; daß das Luteingewebe immer reich an Tween-Esterase-Aktivität ist. (ARVY 1960) MARC QUEN und MONTAGNA (1950) untersuchten die Lipase-Aktivität im Mäuseovar mit der GOMORI-Methode. Die stärkste Reaktion fanden sie im Corpus luteum. Junge Gelbkörper zeigten eine intensivere Reaktion als ältere. Hier lagen im Zytoplasma von 80-90 % der Zellen dunkel-braune Sulfidgranula vor. Eine Lipase-Aktivität zeigte auch das Follikelepithel der Primärfollikel und die Granulosa der Tertiärfollikel, besonders in der Gegend des Cumulus oophorus. Die Eizelle gab keine oder nur eine geringe Reaktion. Während der Follikelatresie nahm die Lipase-Aktivität zu. Im Corpus luteum zeigte sich ein zyklischer Wechsel der Enzym-Aktivität. VERNE und HEBERT (1952a,b) wiesen Esterasen im Ovar der weißen Ratte mit Tween 80, 60 und 40 nach. Sie fanden im Corpus luteum den einzigen Ort einer

Esterase-Aktivität. Im Follikel war das Enzym in keinem Entwicklungsstadium nachzuweisen. Die Reaktion im Corpus luteum war vom Funktionszustand abhängig. In den Luteinzellen zeigten sich Granula verschiedener Größe, die im ganzen Zytoplasma oder kranzförmig in der Peripherie verteilt waren. Auch fand sich eine Esterase-Aktivität in den interstitiellen Zellen. Eine echte Lipase, die sie durch die Aktivierung mit Natrium-Taurocholat gegen die unspezifische Esterase abzugrenzen versuchten, konnten die Autoren nicht darstellen. GOMORI und CHESSICK sahen 1953 eine Tween 60-Esterase im Corpus luteum von Maus und Ratte. Auch ISHIDA (1954, zit. nach AMMON-DIRSCHERL 1959) stellte im Ovar der Ratte die höchsten Lipase-Werte in den atretischen Follikeln fest, während normale Primärfollikel eine negative Reaktion gaben. VERNE veröffentlichte 1955 ebenfalls eine Arbeit über das Rattenovar, wobei er eine Esterase-Aktivität mit der GOMORI-Methode allein im Gelbkörper fand. Hier lagen im Zytoplasma gold-braune Granula vor, während die Kerne hell ausgespart blieben. Der Autor konnte im Ovar auch die Anwesenheit einer echten Lipase beweisen, die durch Natrium-Taurocholat aktiviert wurde. Von ONNIS und MEGA erschien 1957 eine Untersuchung über die Lipase der weiblichen Genitalorgane. Im Ovar fanden die Autoren die Lipase in den Zellen der Granulosa und Theca des Follikels, wo sie einen Zusammenhang mit der Reifung und Funktion des Corpus luteum annahmen. PÜLLE untersuchte 1960 ebenfalls das menschliche Ovar auf seinen Gehalt an Lipasen. Er benützte frische Operationspräparate und die Methode nach GOMORI. Eine positive Tween-Reaktion fand er in der Tunica albuginea und in den Gefäßwänden der venösen und arteriellen Präkapillaren der Markzone. Die Primärfollikel zeigten keine Lipase-Aktivität, erst in größeren Follikeln wurde Granulosa und Theca positiv. Das Corpus luteum enthielt ebenfalls Lipase.

Tabelle 3 : Literaturübersicht über die Lipasen-Esterasen im Ovar

Autor	Jahr	Nachgew.Enz.	Species	Pr.F.	Hilusz.	Tert. Gran.	Foll. Theca	C.l.m.	C.l.grav.	Gef.	Stroma
DEANE	1952	1-napht-acet. Esterase	Ratte	-			+	+		+	
HUNTER, KNEISKE	1957	1-naph-butyr. Esterase	Ratte			+	-	+			
ARVY	1960	naph-acet. Esterase	Kaninchen				+				
JIRASEK	1961	naph-acet Esterase	Frau	-		+	+	+			
MC KAY et al.	1961	unspezif. Esterase	Frau	-	+	+	+	+	+		-
MALATY, BOURNE	1954	Naph-AS-Acet. Esterase	Frau Maus	-	-	-	-	-	-	-	-
CHESSICK	1953	Naph-AS-Acet. Esterase	Frau Maus	-	-	-	-	-	-	-	-
GOMORI	1953	Tween-Esterase	Ratte					+			
MARC QUEN MONTAGNA	1950	Tween-Lipase	Maus	+		+	-	+			
VERNE, HEBERT	1952	Tween-(40,60) Esterase Tween-Lipase	Ratte	- -		- -	- -	+ -	 -		
ISHIDA	1954	Lipase	Ratte	-		+	+				
VERNE	1956	Tween-Lip.	Ratte					+			
ONNIS, MEGA	1957	Tween-Lip.	Frau	-		+	+	+			
PULLE	1960	Tween-Lip.	Frau	-		+	+	+			

5. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) Naphthol-AS-Acetat-Esterase

1. Material und Methodik

Als Material für die vorliegende Untersuchung wurden frische Operationspräparate von geschlechtsreifen Frauen verwendet. 57 Ovarien von 52 Patientinnen wurden untersucht. Es fanden sich 21 Corpora lutea menstruationis und 10 Corpora lutea graviditatis. Von den Schwangerschaftsgelbkörpern stammten 4 aus dem 1. Trimenon, 2 aus dem 2. Trimenon der Gravidität, 3 wurden bei Sectiones und einer 6 Wochen nach der Entbindung entnommen. Alle Präparate wurden wenige Minuten nach der Entnahme fixiert.

Für die Vorbehandlung der Präparate zum Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase sind in der Literatur verschiedene Verfahren vorgeschlagen worden. CHESSICK (1953a,b) verwendete Aceton-, Aceton-Alkonol- und Formalin-fixierte Paraffinschnitte. GOMORI erzielte 1955 die besten Resultate mit Aceton-fixierten Paraffinschnitten. Nach Formalin-Fixierung waren die Ergebnisse unterschiedlich. Er glaubt, daß dabei im allgemeinen nur 50 % der Esterase-Aktivität erhalten bleibt. PEARSON und DEFENDI empfahlen 1957 die Verwendung von Kryostatschnitten. GÖSSNER gab 1958 drei Methoden zur Vorbehandlung der Gewebe an, bei denen die Esterase-Aktivität gut erhalten blieb. 1. Fixierung in kaltem Aceton-Alkohol 1:1, Acetonentwässerung, Paraffineinbettung. 2. Fixierung in kaltem 4 %igem neutralen Formalin, Acetonentwässerung, Paraffineinbettung. 3. Formalin-Fixierung, Einbetten in Karion-Gelatine. Die besten Ergebnisse bezüglich Aktivität der Esterasen und Strukturerhaltung erhielt er nach Formalin-Fixierung. Zum Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase inkubierte GÖSSNER 30-90 Minuten bei 20-25°C. Verschiedene andere Autoren glauben dagegen, daß sowohl Aceton- als auch Formalin-Fixierung bei den Esterasen zu einer be-

trächtlichen Herabsetzung der Enzymaktivität führen. (SELIGMAN et al. 1951, BARNETT 1953, DOYLE und LIEBELT 1954) Sie benötigten dadurch bei manchen Geweben Inkubationszeiten bis zu 16 Stunden. Nach GOMORI und COUTINHO (1953) schädigt Äthylalkohol die Esterasen stärker als die vorgenannten Fixierungsmittel. Auch bei der weiteren Behandlung von fixiertem und eingebettetem Gewebe sollte Alkohol vermieden werden. (NACHLAS und SELIGMAN 1949a)

Zum Nachweis der Naphthol-AS-Acetat-Esterase wurde hier die von GOMORI entwickelte Methode verwandt. (aus PEARSE 1960) PEARSE empfiehlt für diese Methode Aceton-fixierte Paraffinschnitte und Formalin-fixierte Gefrierschnitte. Unsere Präparate wurden folgendermaßen behandelt:

1) Fixierung kleiner Gewebestückchen in 10 %igem Formalin 24 Stunden bei 4°C.
2) Aufziehen von 10-15 µ dicken Gefrierschnitten ohne Aufklebemittel auf Objektträger.
3) Trocknen der Schnitte an der Luft (1-2 Stunden), um ein Festkleben zu erreichen.
4) Inkubation bei 20-22°C in der Substratlösung für 14-16 Stunden.
5) Waschen in fließendem Wasser.
6) Gegenfärben in Mayers Hämalaun 4-5 Minuten.
7) Waschen in fließendem Wasser 30 Minuten.
8) Eindecken in Glycerin-Gelatine.

Herstellung der Substratlösung

Lösung von 200,0 ml 0,05 m Phosphatpuffer pH 7,0
200,0 mg Echtrotsalz TR (5-chlor-o-toluidin)
3,0 ml 1 %iges Naphthol-AS-Acetat.

Da das Naphthol-AS-Acetat in Wasser sehr schlecht löslich ist, wurden folgende Modifikationen zur besseren Lösung des Substrates untersucht:

1) 20,0 ml Aqua dest.+ 200,0 mg Naphthol-AS-Acetat
2) 20,0 ml Phosphatpuffer + 2,0 ml Propylenglykol (als Lösungsvermittler) + 200,0 mg Naphthol-AS-Acetat.

3) 20,0 ml Aqua dest. + 3,0 ml Propylenglykol
+ 200,0 mg Naphthol-AS-Acetat.

Alle Lösungen wurden 10 Minuten mit dem Magnetrührer gerührt. 3,0 ml davon wurden zur übrigen Substratlösung gegeben, das Ganze nochmals gut gerührt und filtriert.

In der Lösung 3) schien das Naphthol-AS-Acetat am besten in Lösung zu gehen. Sie wurde deshalb bei den meisten Präparaten verwendet.

In der von PEARSE (1960) veröffentlichten Methode sind Inkubationszeiten von 30-60 Minuten angegeben. Im Ovar konnte nach einer und nach 2 Stunden noch keine Reaktion gefunden werden. Erst bei ca. 15-stündiger Inkubation zeigte sich Azofarbstoff im Gewebe.

Beim Eindecken mit Diatex oder Kanadabalsam löste sich der entstandene Azofarbstoff nahezu vollständig im Deckmittel. Es mußte deshalb Glycerin-Gelee verwendet werden, obwohl durch die vielen darin entstehenden Luftblasen die meisten Präparate nicht photographiert werden konnten.

2. Hemmung

Als Inhibitoren wurden bei einigen Präparaten dem Inkubationsmedium zugefügt:

1. 0,005 m Natrium-Taurocholat
2. 1 mg/ml Priscol^{R} (Ciba, Hydrochlorid des 2-Benzyl-imidazolin)

In den Präparaten mit Natrium-Taurocholat-Zusatz wurde eine deutliche Hemmung beobachtet. Die über das Stroma verteilten Azofarbstoffkristalle und die Reaktion in den Gefäßwänden waren völlig verschwunden. Nur im Corpus luteum und in den Follikeln blieb noch eine ganz schwache Esterase-Aktivität ernalten.

Mit Priscol konnte keine Inhibition der Esterase erreicht werden. Die Enzym-Reaktion besaß die gleiche Intensität wie in den Kontrollpräparaten ohne Inhibitor.

3. Befunde.

An den Stellen der Enzym-Aktivität fand sich ein purpurroter Azofarbstoff, der nach wenigen Stunden in den meisten Präparaten in langen Nadeln auskristallisierte. Auch PEARSE (1960) hatte diese Kristallisation in größeren Partikeln schon als Nachteil bei der Verwendung von Echtrotsalz TR beschrieben. Eine genauere intrazelluläre Lokalisation konnte nur an wenigen Präparaten, wo der Farbstoff fein verteilt blieb, untersucht werden. In diesen Präparaten war der Azofarbstoff in feinen Granula diffus über das ganze Zytoplasma verteilt. Eine Kernfärbung konnte auch bei der verhältnismäßig langen Inkubationszeit nirgends beobachtet werden. Allerdings fanden sich einzelne Kristallnadeln, wohl als Diffusionsartefakt, gleichmäßig über das ganze Stroma verteilt.

Lokalisation der Naphthol-AS-Acetat-Esterase im Ovar:

Stroma. In der Rinde schien die Verteilung der Kristallnadeln etwas dichter zu sein als im Mark. Die Wände der größeren und kleineren Gefäße zeigten meist eine deutlich positive Reaktion. In Nerven und Hiluszellen wurden in keinem Präparat eine Reaktion gefunden.

Primärfollikel. In den meisten Primärfollikeln wurden keine Azofarbstoff-Kristalle beobachtet. Die Eizelle und das Follikelepithel enthielten ebenfalls keine Naphthol-AS-Acetat-Esterase.

Sekundär- und Tertiärfollikel. Im Gegensatz zur sauren Phosphatase zeigte sich bei der Naphthol-AS-Acetat-Esterase die weitaus stärkste Aktivität nicht im Corpus luteum, sondern in den Follikeln. In allen Follikeln war die Theca interna intensiv gefärbt, während die Granulosa meist keinen Azofarbstoff enthielt. In einzelnen Follikeln wurden auch in der Granulosa wenige Kristalle gefunden. Wahrscheinlich ist dies aber ein Diffusionsartefakt, da in den Präparaten ohne Kristallisation des Azofarbstoffes die Granulosa nie eine Esterase-Ak-

tivität zeigte. Die Reaktion in der Theca interna schien unabhängig von der Größe der Follikel. Auch in kleinen Follikeln fand sich eine starke Aktivität. Ein Unterschied in der Reaktion zwischen reifenden und atretischen Follikeln konnte nicht festgestellt werden. Eine Eizelle mit positiver Esterase-Reaktion wurde nicht beobachtet.

In einigen Präparaten von graviden Patientinnen fanden sich mehrere Thecaorgane. Sie zeigten ebenfalls eine starke Reaktion in der breiten Theca-interna-Schicht und eine negative Granulosa.

Corpus luteum menstruationis. Alle untersuchten Gelbkörper wiesen eine Esterase-Aktivität auf. Die Intensität der Reaktion war schwächer als in den Follikeln. Eine Unterscheidung zwischen der Reaktion der Theca- und Granulosaluteinzellen war infolge der Kristallnadel-Bildung nicht möglich. Die Corpora lutea verschiedenen Alters zeigten nur geringe Aktivitätsunterschiede. Eine intensive Reaktion lag bei den 3-12 Tage alten Corpora lutea vor. Hier schienen auch die Thecaluteinzellen in manchen Präparaten etwas stärker gefärbt zu sein als die Granulosaluteinzellen. Nach der Menstruation nahm die Esterase-Aktivität ab. Ein negatives Corpus luteum wurde aber nicht gefunden. Auch die etwa 30 Tage post ovulationem alten Gelbkörper zeigten noch eine geringe Reaktion, die bei Theca- und Granulosaluteinzellen gleich stark war. Das Bindegewebe in den Corpora lutea und in der medianen Höhle zeigte keine Reaktion.

Corpora lutea graviditatis. Die Corpora lutea graviditatis zeigten eine stärkere Aktivität als die Corpora lutea menstruationis. Eine so intensive Reaktion wie in der Theca der Follikel wurde aber auch hier nicht gefunden. Die Gelbkörper aus dem ersten Trimenon, von der Mitte und vom Ende der Schwangerschaft reagierten etwa gleich stark. Auch in dem 6 wochen post partum entnommenen Corpus luteum war noch eine mäßige Enzym-Aktivität vorhanden. Sie war aber deutlich schwächer

als bei den jüngeren Gelbkörpern. In den meisten Präparaten schien auch die Reaktion in den Thecaluteinzellen stärker zu sein, in einigen konnten aber keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden. Das Bindegewebe wies keine Esterase auf, nur in den Wänden der Kapillaren wurden vermehrt Farbstoffkristalle gefunden. Alle untersuchten Corpora albicantia zeigten keine Esterase-Reaktion.

b) Lipasen-Esterasen

1. Material und Methodik.

Insgesamt wurden für die Reaktionen mit Tween-Substraten 90 Ovarien mit 25 Schwangerschaftsgelbkörpern von Frauen im Alter von 20-60 Jahren untersucht. Zur Kontrolle wurden bei einigen Reaktionen Präparate von Leber, Niere und Pankreas von Ratten und Meerschweinchen mit inkubiert.

Ein Teil der Präparate wurde nach dem von GOMORI (1945) vorgeschlagenen Verfahren 24 Stunden in kaltem Aceton fixiert und in Paraffin eingebettet. Diese Vorbehandlung wird von den meisten Autoren empfohlen. (WACHSSTEIN 1946, GOMORI 1949, VERNE und HEBERT 1952a,b, GOMORI und CHESSICK 1953) Auch RICHTERICH (1952) hält Aceton (8 Stunden) für das beste Fixierungsmittel. Nach 24-stündiger Formalin-Fixierung fand er 45 % Aktivitätsverlust. HOLT et al. (1960) stellten nach 12-24 Stunden Formalin-Fixierung sogar eine Herabsetzung der Esterase-Aktivität um 52-65 % fest. PEARSE empfiehlt neben Aceton-fixierten Paraffinschnitten auch Formalin-fixierte Gefrierschnitte. Bei der vorliegenden Untersuchung wurde daher ein großer Teil der Präparate 12-24 Stunden in kaltem 10 %igem neutralem Formalin fixiert und auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Für einige Präparate wurden unfixierte Kryostatschnitte verwandt. Diese reagierten immer negativ.

Bei den Fermentnachweisen mit der Tween-Reaktion wurden in der Literatur längere Inkubationszeiten als

bei den Azofarbstoffmethoden angegeben. GOMORI inkubierte 1945 6-12 Stunden, 1949 6-18 Stunden und 1952 8-24 Stunden. WACHSSTEIN (1946) gab Inkubationszeiten von 40-48 Stunden (bei 37°C) und VERNE und HEBERT (1952a,b) von 22-23 Stunden an. RICHTERICH empfahl 1952 für Tween-60-Esterase Kryostatschnitte, die eine Stunde in Aceton nachfixiert wurden. Er inkubierte diese nur 1-3 Stunden.

2. Methoden.

Zunächst wurde zum Nachweis der Lipase die von GOMORI für "true lipase" vorgeschlagene Methode benutzt. (aus PEARSE 1960)

1) Aufziehen von fixierten Schnitten ohne Aufklebemittel auf Objektträger.
2) Trocknen der Schnitte an der Luft (1-2 Stunden), um ein Festkleben zu erreichen.
3) Inkubation der Präparate bei 45°C in der Substratlösung für 8-24 Stunden.
4) Waschen in dest. Wasser
5) Einstellen in 1-2 %ige Bleinitratlösung bei 54°C 10-15 Minuten.
6) Mehrmaliges gründliches Waschen in dest. Wasser.
7) Einstellen in verdünntes gelbes Ammoniumsulfid für 1-2 Minuten.
8) Waschen in fließendem Wasser.
9) Gegenfärben in Eosin (4-5 Minuten).
10) Gründliches Waschen in fließendem Wasser.
11) Eindecken in Diatex.

Herstellung der Substratlösung.

Lösung von 20,0 ml 0,2 m Veronal-Acetat-Puffer pH 7,2-7,4
8,0 ml 10 %iges Kalziumchlorid
8,0 ml 5 %ige Lösung von Tween 80 in Wasser
160,0 ml Aqua dest.
1 kleiner Kristall Thymol

Da der zunächst verwendete Tween 80 nicht völlig in Wasser löslich war, wurde bei einem Teil der Präparate zur besseren Lösung 2 ml Aceton zugegeben. Zu Beginn

wurden die Präparate 8-10 Stunden inkubiert. Als damit keine befriedigenden Ergebnisse zu erzielen waren, wurde die Inkubationszeit auf 24 Stunden verlängert.

Parallel zu der Methode mit Tween 80 wurde ein von MARTIN angegebener Nachweis einer Lipase-Esterase mit Tween 40 durchgeführt.

Die Methode unterscheidet sich nur durch ein anders zusammengesetztes Inkubationsmedium von dem oben beschriebenen Lipasen-Nachweis.

Herstellung der Substratlösung

Lösung von 120,0 ml 0,1 m Michaelispuffer pH 7,4
10,0 ml 10 %iges Kalziumchlorid
60,0 ml Glycerin
12,0 ml Stammlösung

Herstellung der Stammlösung

Lösung von 120,0 ml Michaelispuffer pH 7,2-7,6
0,24 mg Kalziumchlorid
2,4 ml Tween 40
1 Kristall Thymol

Diese Stammlösung wurde bei 37° C 2 Tage inkubiert und vor Verwendung durch ein Faltenfilter filtriert. Bei einigen Präparaten wurde zur besseren Lösung des Tween 40 2 ml Aceton zugegeben.

Da es nicht gelang, mit diesen beiden Tween-Methoden die Lipasen-Esterasen im Ovar nachzuweisen, wurden zur Kontrolle noch zwei weitere Reaktionen angewandt. Der Lipase-Nachweis nach GOMORI (aus Handbuch der Histochemie (DEANE, BARRNETT, SELIGMAN) Band VII/I S.101) wurde mit Tween 80 (zum Nachweis einer "echten Lipase") und mit Tween 40 (zum Nachweis einer Lipase-Esterase) durchgeführt.

Die Methode für Gefrierschnitte war die gleiche wie bei den anderen Tween-Reaktionen. Ein Unterschied bestand nur in der Zusammensetzung der Substratlösung.

Herstellung der Substratlösung

Lösung von 180,0 ml Trispuffer pH 7,2 (Hydroxy-methyl-amino-methan)
12,0 ml 2 %iges wäßriges Kalziumchlorid

4,0 ml Tweenstammlösung (filtrierte Lösung von 5 %igem Tween 80 bzw. Tween 40 in Trispuffer unter Zusatz von 0,5 % Kalziumchlorid

Außerdem wurde die Lipase auch mit der von RICHTERICH für Tween 60 oder 40 vorgeschlagenen Modifikation mit Tween 80 nachgewiesen. Die Methode entsprach den anderen Enzymnachweisen mit Tween-Substraten. Die Schnitte wurden 24 Stunden bei 45°C inkubiert.

Herstellung der Substratlösung

Lösung von 6,0 ml Michaelispuffer pH 7,0-7,4
30,0 ml 5 %ige wäßrige Lösung von Tween 80
14,0 ml 10 %iges wäßriges Kalziumchlorid
150,0 ml CO_2-freies Aqua dest.

Bei einem Teil der Präparate für den Lipase-Nachweis (mit Tween 80) wurde 0,005 m Natrium-Taurocholat zur Kontrolle zum Inkubationsmedium gegeben.

2. Befunde

Bei dem zunächst an Gefrierschnitten angewendeten Lipase-Nachweis nach GOMORI konnten die Ergebnisse des Autors nicht reproduziert werden. Ebenso waren beim Nachweis der Lipase-Esterase mit Tween 40 nach MARTIN die Befunde nicht zu bestätigen. In allen Präparaten fand sich ein leichter schwarzer, tröpfchensrtiger Niederschlag, der gleichmäßig über den ganzen Schnitt verteilt war. Eine längere Inkubationszeit verbesserte das Ergebnis nicht. Da der verwendete Tween in wasser nicht völlig löslich war, wurden bei einigen Präparaten 2 ml Aceton zugegeben. Daraufhin war der Niederschlag etwas mehr fein-granulär. In einigen Fällen konnte auch eine Anhäufung der Sulfidgranula in den Wänden von Kapillaren und kleinen Gefäßen beobachtet werden. In zwei Fällen schien auch eine schwache Aktivität im Corpus luteum menstruationis und in Corpora albicantia vorhanden zu sein. Meistens war der Niederschlag aber immer noch gleichmäßig über den ganzen Schnitt verteilt. Durch die Benutzung von Tween-Estern verschiedener Herkunft wurde

ein Versagen eines der konfektionierten Substrate ausgeschlossen. Auch in Aceton-fixierten Paraffinschnitten und in unfixierten Kryostatschnitten konnte mit der Methode keine Lipase mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Zur Kontrolle wurde der Lipase-Nachweis nach der Methode von RICHTERICH (1952) und nach DEANE, BARNETT und SELIGMAN (aus Handbuch der Histochemie) durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden auch Schnitte aus Leber, Niere und Pankreas von Meerschweinchen und Ratten mituntersucht. In diesen Organen konnte mit Tween 80 eine Lipase und mit Tween 40 eine Lipase-Esterase nachgewiesen werden. In Leberzellen, Nierentubuli, Drüsenzellen und Ausführungsgängen des Pankreas und in den Gefäßen zeigte sich mit allen angewandten Verfahren eine beträchtliche Lipase-Esterase-Aktivität. Die intensivste Reaktion wurde mit der Methode nach GOMORI (aus PEARSE 1960), die schwächste mit der Methode nach DEANE, BARRNETT, SELIGMAN (Handbuch der Histochemie) mit Trispuffer erzielt. In den Präparaten vom Ovar konnte dagegen keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. In einigen Fällen wurden ziemlich große schwarze Schollen gefunden, die sicher Artefakte sind. Die anderen Präparate zeigten wieder einen diffusen groben Niederschlag, der nur an wenigen Stellen in Gefäßwänden etwas dichter schien.

In den Präparaten, bei denen zur Kontrolle 0,005 m Natrium-Taurocholat zugefügt worden war, fanden sich dagegen Zeichen einer Fermentaktivität. Die stärkste Reaktion zeigte sich wieder in den Wänden aller Gefäße, wo zahlreiche feine schwarze Sulfidgranula zu erkennen waren. Auch in den Granulosazellen von Corpora lutea menstruationis war eine schwache Lipase-Aktivität nachzuweisen. Allerdings zeigte sich nicht im Zytoplasma aller Luteinzellen ein Niederschlag. In einem Corpus luteum graviditatis aus dem ersten Trimenon der Schwangerschaft war dagegen keine Reaktion festzustellen, obwohl in diesem Präparat eine besonders starke Reaktion

in den Gefäßwänden vorhanden war. Auch in den Tertiärfollikeln war eine schwache Aktivität zu sehen, vorwiegend in der Theca. In einigen Ovarien von schwangeren Frauen wurden Thecaorgane gefunden, die eine negative Granulosa und eine schwache Reaktion in der Theca interna erkennen ließen. Primär- und Sekundärfollikel konnten nicht festgestellt werden. In einigen Präparaten wurde auch im Corpus albicans eine schwache Lipase-Aktivität nachgewiesen. Über das ganze Corpus albicans verteilt fand sich eine größere Anzahl feinster Sulfidgranula.

Die Kontrollpräparate ohne Zusatz von Natrium-Taurocholat ließen wie immer nur einen diffusen, grobkörnigen schwarzen Niederschlag erkennen. In der Leber fand sich mit Natrium-Taurocholat eine deutliche Hemmung. Die Aktivität im Pankreas war unverändert.

C. AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Nach den vorliegenden Untersuchungen besitzt das menschliche Ovarium eine beträchtliche Aktivität der sauren Phosphatasen, wobei die hier nachgewiesenen Verteilung des Enzyms gut mit den bisherigen Ergebnissen der Literatur übereinstimmt. (MC KAY et al. 1961, DEANE et al. 1962) Nur die von MC KAY beschriebene Aktivität in der Eizelle des reifen Follikels konnte nicht bestätigt werden. Auch wurde eine gegenüber dem Blütestadium vermehrte Aktivität des degenerierenden Corpus luteum menstruationis nicht nachgewiesen. DEANE fand im Gegensatz zu unseren Ergebnissen keine Enzymreaktion im reifenden Follikel und eine im Laufe der Schwangerschaft zunehmende Aktivität des Corpus luteum graviditatis.

Die saure Phosphatase-Aktivität im Ovar ist mit der von LOBEL et al. 1961, und NOVIKOFF 1959 vermuteten Funktion des Enzyms bei der intrazellulären Verdauung und Autolyse allein nicht zu erklären. Es wurde die saure Phosphatase nicht nur in atretischen Follikeln, wo sie eine Bedeutung bei der Regression haben kann, sondern auch im reifenden Follikel gefunden. Sekundär- und Tertiärfollikel ohne Enzymaktivität wurden nie beobachtet. Die Reaktion in der Theca interna war sogar besonders intensiv. Auch die hohe Aktivität des Corpus luteum menstruationis und des Corpus luteum graviditatis im ersten Trimenon der Schwangerschaft, sowie die Reaktion der Hiluszellen sind nicht durch Regressionsvorgänge zu erklären. Die Lokalisation der sauren Phosphatasen in allen endokrin aktiven Strukturen des Ovars (Theca der Follikel, Corpus luteum, Hiluszellen) kann als Hinweis auf eine Beteiligung der sauren Phosphatase an der Produktion der Ovarialnormone angesehen werden. Auch die Aktivität im atretischen Follikel könnte dadurch bedingt sein. Bis heute kann man natürlich nichts darüber aussagen, ob die sauren Phosphatasen direkt in den Steroidstoffwechsel eingreifen. Sie

könnten auch nur eine indirekte Funktion wie z.B. beim Stofftransport haben und deshalb in besonders Stoffwechsel-aktiven Strukturen angereichert sein. Die Aktivität des Enzyms in den Gefäßen läßt sich durch eine Beteiligung der sauren Phosphatase bei der intrazellulären Verdauung und der Steroidproduktion nicht erklären. Man muß annehmen, daß die wirklichen Funktionen der sauren Phosphatase doch von komplexer Natur und bis heute unbekannt sind.

Im menschlichen Ovar wurde bisher keine Naphthol-AS-Acetat-Esterase nachgewiesen. MALATY und BOURNE(1954) und CHESSICK (1953), die den Eierstock daraufhin untersuchten, fanden keine Reaktion. Die Enzym-Aktivität ist auch nicht so intensiv wie z.B. die der Phosphatasen. Möglicherweise war die von den erwähnten Autoren verwendete Alkohol- und Aceton-Fixierung die Ursache des negativen Ausfalls der Reaktion, da diese Fixierungsmittel die Enzym-Aktivität mehr herabsetzen als eine Formalin-Fixierung. (GOMORI und COUTINHO 1953) Auch HUNTER und KNEISKE fanden 1957 eine vollständige Zerstörung der Esterase-Aktivität nach Acetonfixierung. Sie nahmen an, daß nur die Esterasen zerstört werden, die kurzkettige Ester hydrolysieren (Naphthol- und Naphthol-AS-Substrate). Tween-spaltende Enzyme wurden nicht angegriffen.

Die Verteilung der Naphthol-AS-Acetat-Esterase im Ovar in der vorliegenden Untersuchung entspricht den Ergebnissen von MC KAY et al. 1961. Das Substrat dieser Autoren wird allerdings nicht angegeben. Die Befunde von JIRASEK (1961), der mit 1-Naphthyl-Acetat als Substrat Esterase im menschlichen Ovar untersuchte, stimmen dagegen nicht mit unseren Ergebnissen überein. Dieser Autor fand eine Aktivität in der Eizelle des Primärfollikels, in der Granulosa des Tertiärfollikels und im Corpus luteum eine stärkere Aktivität in den Granulosaluteinzellen. Die unterschiedlichen Ergebnisse können durch die Methode bedingt sein, würden aber

auch dafür sprechen, daß das 1-Naphthyl-Acetat zumindest teilweise noch durch andere Esterasen gespalten wird als das Naphthol-AS-Acetat, was von verschiedenen Autoren angenommen wird. (GOMORI 1952b, GOMORI und CHESSICK 1953, CHESSICK 1953)

VERNE stellte 1956 keinen Zusammenhang der Lokalisation der Esterase mit der Produktion von Steroidhormonen fest. Er fand bei mehreren Untersuchungen im Ovar eine Tween-Esterase nur im Corpus luteum. Die Follikel zeigten keine Aktivität. Da er auch in der Nebennierenrinde und in der Hypophyse keine Esterase nachweisen konnte, glaubte er, daß die unspezifischen Esterasen nur eine Rolle bei der Progesteronbildung im Corpus luteum und bei der Testosteronbildung im Hoden spielen, die Östrogenbildung aber in Abwesenheit dieser Enzyme vor sich gehe. In unseren Untersuchungen zeigte sich die intensivste Esterase-Reaktion in der Theca interna der Follikel. Dies spricht dafür, daß die Tween-spaltenden und die Naphthol-AS-Acetat-spaltenden unspezifischen Esterasen verschiedene physiologische Funktionen haben. Nach den eigenen Befunden muß eine Beteiligung der Naphthol-AS-Acetat-Esterase bei der Progesteron- und vor allem bei der Östrogenbildung angenommen werden. Daneben dürfte dieses Enzym weitere, bis jetzt noch unbekannte Aufgaben im Stoffwechsel des Ovars haben. Dafür spricht wie bei den sauren Phosphatasen die gleichbleibende Aktivität des Corpus luteum, unabhängig von seinem Alter und die Reaktion in den Gefäßwänden.

Für die Schwierigkeiten beim Lipase-Nachweis im Ovar gibt es wahrscheinlich verschiedene Ursachen. Daß es im Eierstock echte Lipasen und auch Tween-Esterasen gibt, muß als sicher angenommen werden, da sie von verschiedenen Autoren beim Menschen(ONNIS und MEGA 1957, PULLE 1960) und bei Tieren (MARC QUEN und MONTAGNA 1950, VERNE und HEBERT 1952, ISHIDA 1954, VERNE 1956) nachgewiesen worden sind. Auf der anderen Seite ist aber auch auf die Schwierigkeiten dieser Nachweismethoden mit

Tween-Substraten hingewiesen worden. (RICHTERICH 1952, PEARSE 1960) VERNE und HEBERT (1952a) konnten im Ovar der Ratte zwar Tween-Esterase, aber keine echte Lipase darstellen. Der Gehalt des Ovars an Lipase ist also wahrscheinlich sehr gering. Durch die von uns angewendete Formalin-Fixierung wurde ein Teil der Aktivität zerstört (nach RICHTERICH ca. 45 %), so daß die Lipase-Rest-Aktivität für einen histochemischen Nachweis nicht mehr ausreichte. Nach RICHTERICH (1952) ist auch ein Zusatz von Glycerin, wie er bei den Methoden von MARTIN und GOMORI angegeben wird, nicht günstig, da Glycerin ein Extraktionsmittel für Lipasen ist. Dies ist wohl auch der Grund, weshalb wir eine Tween-Esterase nicht nachweisen konnten.

Die Vermutung einer "unterschwelligen" Lipase-Aktivität konnten wir durch die Darstellung des Enzyms nach Aktivierung mit Natrium-Taurocholat beweisen. Ein Zeichen für den geringen Lipase-Gehalt der verschiedenen Strukturen des Ovars ist auch der Nachweis der größten Enzym-Aktivität in den Gefäßwänden. Dabei unterliegt es keinem Zweifel, daß das in Spuren im Ovar nachgewiesene Ferment eine echte Lipase ist, da sie durch Natrium-Taurocholat deutlich aktiviert wurde. Für die unspezifischen Esterasen ist dieser Stoff ja ein wirksamer Inhibitor, was auch an der Reaktion mit Naphthol-AS-Acetat gezeigt werden konnte.

Die gefundene Aktivität im Corpus luteum und geringer im Follikel stimmt im wesentlichen mit den Befunden anderer Autoren überein. ONNIS, MEGA und PULLE konnten eine Reaktion im Corpus luteum, sowie in der Theca und Granulosa von Tertiärfollikeln feststellen. Für eine genaue Lokalisation der Aktivität im Follikel war in unseren Untersuchungen die Reaktion zu schwach.

Eine Beteiligung der Lipasen bei der Hormonproduktion scheint nach dem Vorkommen im Ovar nicht sehr wahrscheinlich. Im älteren Corpus luteum wäre eine

Funktion der Lipase beim Lipidabbau denkbar, wofür auch der Nachweis des Enzyms im degenerierenden Corpus luteum menstruationis und das Fehlen einer Fermentaktivität im jungen funktionierenden Corpus luteum graviditatis sprechen kann. Auch eine Bedeutung der Lipasen beim Lipidaufbau nach dem Follikelsprung ist zu erwägen. Das Vorkommen des Enzyms im reifen Follikel könnte so erklärt werden. Die synthetisierende Funktion der Lipasen ist schon lange bekannt.

Zusammenfassung

A. Saure Phosphatasen

Saure Phosphomonoesterasen sind Hydrolasen, die unter Wasseraufnahme Monoester der Phosphorsäure spalten und ihr pH-Optimum im sauren Bereich haben. Die drei verschiedenen Typen sind mit histochemischen Methoden nicht zu differenzieren. Wahrscheinlich können die sauren Phosphatasen im Stoffwechsel außer der Hydrolyse von Phosphorsäureestern unter bestimmten Bedingungen auch Synthesen und Transferierungsvorgänge katalysieren. Sie kommen in den Lysosomen vor und möglicherweise haben sie eine besondere Funktion bei der intrazellulären Verdauung.

Histochemisch können die sauren Phosphatasen mit der von GOMORI entwickelten Metallsalzmethode nachgewiesen werden, bei der an der Stelle der Enzymaktivität braunes Bleisulfid gebildet wird. Als Artefakt tritt bei dieser Methode Kernfärbung auf. Eine gute Nachweistechnik ist die Azokupplungsmethode nach GROGG und PEARSE mit Naphthol-Derivaten als Substrat und Echtblausalz B als Diazoniumsalz. Hier findet sich, ebenso wie bei einer von RUTENBURG und SELIGMAN angegebenen sukzedanen Azofarbstoffmethode, die Enzymaktivität ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Die von HOLT entwickelte Technik gibt im sauren Bereich keine befriedigenden Ergebnisse. Die Resultate der Azofarbstoff-Technik über die intrazelluläre Lokalisation der sauren Phosphatase ergeben eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer biochemischer Untersuchungen am Homogenat.

Für die vorliegende Untersuchung wurden vorwiegend Formalin-fixierte Gefrierschnitte von insgesamt 75 Ovarien benutzt. Beim Nachweis der sauren Phosphatase mit der Azofarbstoffmethode nach GROGG und PEARSE (Inkubation 4-10 Stunden) und der Metallsalzmethode nach GOMORI (Inkubation 10-12 Stunden) wurde in den endokrinen Strukturen des Ovars eine Enzymaktivität lokalisiert. Die

Ergebnisse der beiden Methoden sind identisch.

Die Primärfollikel wiesen keine Aktivität auf. Sekundär- und Tertiärfollikel zeigten eine saure Phosphatase-Reaktion in der Granulosa, die Eizelle war negativ. Mit der Reifung der Follikel nahm die Aktivität in der Granulosa ab, während die Reaktion in der Theca zunahm. In den atretischen Primärfollikeln fand sich ein positives Follikelepithel und eine schwache Aktivität im Protoplasma der Eizelle. In atretischen Bläschenfollikeln war die Reaktion in der Granulosa stärker als im reifenden Follikel. Alle Corpora lutea zeigten eine intensive Reaktion. Die saure Phosphatase-Aktivität blieb von den ersten Tagen nach der Ovulation bis zur Menstruation unverändert bestehen und nahm dann langsam ab. Der Schwangerschaftsgelbkörper wies eine noch intensivere Reaktion der sauren Phosphatase auf als das Corpus luteum menstruationis. Die Reaktion blieb während der ganzen Dauer der Gravidität bestehen und nahm erst nach der Entbindung ab. Auch die Hiluszellen zeigten eine mäßige saure Phosphatase-Aktivität. In den Gefäßwänden wurde ebenfalls saure Phosphatase nachgewiesen.

B. Lipasen-Esterasen

Lipasen und Esterasen gehören zu den gruppenspezifischen Carboxylsäureesterasen mit geringer Substratspezifität. Sie werden durch ihr Vorkommen und durch unterschiedliche Empfindlichkeit gegen Hemmstoffe unterschieden. Esterasen werden vorwiegend in der Leber gefunden und spalten meist Ester mit kürzeren Ketten. Lipasen kommen vor allem im Pankreas vor. Sie hydrolysieren kurz- und langkettige Ester gleich gut.

Auch zum histochemischen Nachweis der Lipasen-Esterasen hat GOMORI eine Metallsalzmethode mit Tween-Substraten entwickelt. Als spezifisches Substrat zum Nachweis der Lipase gilt Tween 80. Verschiedene Autoren gaben Azofarbstoffmethoden an, wobei meist einfache oder substituierte Naphthol-Ester als Substrate Verwendung fanden.

Gut geeignet für den Esterase-Nachweis ist auch die Indoxyltechnik von BARRNETT, SELIGMAN und HOLT. Mit allen diesen Methoden wurden die Lipasen-Esterasen im Zytoplasma gefunden. Genauere Untersuchungen ergaben eine Lokalisation in den Mikrosomen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine unspezifische Esterase mit der Methode nach GOMORI (1952) mit Naphthol-AS-Acetat nachgewiesen. Formalin-fixierte Gefrierschnitte von 57 Ovarien wurden 15 Stunden in der Substratlösung inkubiert. Die intensivste Reaktion fand sich in der Theca interna der Follikel. Die Granulosa der Tertiärfollikel zeigte, ebenso wie die Primärfollikel und die Eizellen, keine histochemisch erfaßbare Aktivität. Das Corpus luteum menstruationis wies immer eine mäßige Aktivität auf, die in den Thecaluteinzellen oft etwas intensiver war als in der Granulosa. Der Enzymgehalt des Gelbkörpers war von seinem Alter unabhängig. Auch die degenerierenden Corpora lutea wiesen noch eine Reaktion auf. Die Reaktion des Corpus luteum graviditatis war intensiver als die des Corpus luteum menstruationis, blieb aber in allen Stadien der Schwangerschaft ziemlich konstant. Auch 6 Wochen post partum war noch eine mäßige Aktivität nachzuweisen. Eine Reaktion der Hiluszellen wurde in keinem Präparat festgestellt. Das Stroma zeigte keine Enzym-Aktivität, während die Gefäße einen beträchtlichen Esterase-Gehalt aufwiesen.

Die Naphthol-AS-Acetat-Esterase wurde durch 0,005 m Natrium-Taurocholat nahezu vollständig genommt; ein Zusatz von "Priscol" hatte dagegen keinen Einfluß auf die Enzym-Aktivität.

Zum Nachweis einer Lipase-Esterase im menschlichen Ovar wurden 90 Eierstöcke mit den von GOMORI, MARTIN, RICHTERICH und DEANE, BARRNETT und SELIGMAN angegebenen Reaktionen mit Tween-Substraten untersucht. Es wurden dabei vorwiegend Formalin-fixierte Gefrierschnitte verwendet, die 10-24 Stunden inkubiert wurden. In den meisten Präparaten war damit keine Tween-80-spaltende Li-

pase und Tween-40-spaltende Esterase nachzuweisen. Schnitte von Leber, Pankreas und Niere von Ratten und Meerschweinchen wiesen mit den gleichen Methoden dagegen eine beträchtliche Enzym-Aktivität auf. Nur in einigen Präparaten vom Ovar, bei denen der Inkubationslösung 0,005 m Natrium-Taurocholat zugefügt worden war, konnte eine schwache Lipase-Aktivität festgestellt werden. Eine leicht positive Reaktion fand sich in den Gefäßwänden, den Follikeln und im Corpus luteum. Eine Tween-40-spaltende unspezifische Esterase konnte im Ovar nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Ergebnisse der Enzymnachweise

Ferment	Pr. EZ	Foll. Epi	Sek. EZ	Tertf. Gr	Tertf. The	Atret. EZ	Atret. Gr	Atret. The	C.l.m.I GrL	C.l.m.I TheL	C.l.m.II GrL	C.l.m.II TheL	C.l.grav. GrL	C.l.grav. TheL	Hilz	Gef	T.alb	Stroma Rinde	Stroma Mark	C.alb
SAURE PHOSPHATASE	-	-	-	(+)	+	(+)	+	+	++	++	+	(+)	+++	++	+	+	(+)	-	-	-
NAPHTHOL-AS-ESTERASE	-	-	-	-	+++	-	-	+++	+	+	(+)	(+)	++	++		++	-	(+)	-	-
LIPASE (nach Aktivierung mit Na-Taurocholat)				-	(+)	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-		+	-	-	-	(+)

Erklärung der Abkürzungen:

EZ = Eizelle
Gr = Granulosazellen
The = Thecazellen
GrL = Granulosaluteinzellen
TheL = Thecaluteinzellen
T.alb = Tunica albuginea

Hilz. = Hiluszellen
C.alb. = Corpus albicans
Pr.Foll. = Primärfollikel
C.L.m.I = Corpus luteum menstruationis (1-8 Tage post ovul.)
C.l.m.II = Corpus luteum menstruationis (ab 8 Tage post ovul.)

LITERATURVERZEICHNIS

1) ABOLINS L. u. ABOLINS A. (1949): Different kinds of phosphatases in various cytological structures of the anterior pituitary of the guinea pig. Nature (London) 164, 455.

2) ABUL-FAD´L M., NG.van THOAI u. J.ROCHE. (1949): Purification of alkaline phosphatase. Biochem. J. 44, 428.

3) ALAMANI V. u. P. MANGIONE (1956): Histochemische Beurteilung der endokrinen Strukturen des Ovars in Beziehung zum Zyklus. Riv. Obstetr. (Firenze) 11, 689.

4) AMMON A.u.W.DIRSCHERL (1959): Fermente. Hormone. Vitamine. Band 1: Fermente. 3. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart.

5) APPELMANS F., R.WATTIAUX u.C.DE DUVE (1955): The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmatic granules in rat liver. Biochem. J. 59, 438.

6) APPLEYARD J. (1948): The effect of alkohols on the hydrolysis of sodium phenolphtalein diphosphate by prostatic extracts. Biochem. J. 42, 596.

7) ARVY L. (1954): Répartition des activités phosphatasiques et lipasiques chez quelques téléostéens. C.R.Ass. Anat., Gênes 836-842.

8) ARVY L. (1960): Contribution à l´histoenzymologie de l´ovaire. Zeitschr. f. Zellforschung 51, 406.

9) AUGUSTIN E., O.HEIDENREICH u.A.THILO (1954): Vorkommen und Aktivität der Phosphomonoesterase im Genitaltrakt der weiblichen Ratte und Beeinflußung durch Ovarialhormone. Arch. Gyn. 184, 281.

10) AXELROD B. (1948): A new mode of enzymatic phosphat transfer. J. biol. Chem. 172, 1.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

11) AXELROD B. (1955): Nonoxydative, nonproteolytic enzymes.
Ann. Rev. Biochem. 24, 45.

12) BALDWIN E.(1952): Dynamic aspects of biochemistry. 2. Auflage. Cambridge Univ. Press, London.

13) BARKA T. (1960): A simple azo-dye method for histochemical demonstration of acid phosphatase.
Nature (London) 187, 248.

14) BARRNETT R.J. (1952a): Distribution of esterases in tissues of the rat as demonstrated by a new histochemical method.
Anat. Rec. 112, 307.

15) BARRNETT R.J. (1952b): The distribution of esterolytic activity in the tissues of the albino rat as demonstrated with indoxyl acetate.
Anat. Rec. 114, 577.

16) BARRNETT R.J. (1953): Effects of fixation and of enzymatic inhibitors on the histochemistry of esterase.
Anat. Rec. 115, 386.

17) BARRNETT R.J. u. A.M.SELIGMAN (1951): Histochemical demonstration of esterase by production of indigo.
Science 114, 579.

18) BERTHET J. u. C.DE DUVE (1951): The existence of a mitochondria-linked, enzymically inactive form of acid phosphatase in rat-liver tissue.
Biochem. J. 50, 174.

19) BERTHET J., L.BERTHET, F.APPELMANS u. C.DE DUVE (1951): Tissue fractionation studies. 2. The nature of the linkage between acid phosphatase and mitochondria in rat-liver tissues.
Biochem. J. 50, 182.

20) BURKL W. u. G.KELLNER (1954): Der Einfluß von Myleran auf das Wachstum der Follikel im Rattenovar.
Anat. Anz. 100, 322.

21) BURSTONE M.S. (1957): The cytochemical localisation

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

of esterase.
J. Nat. Cancer Inst. 18, 167.

22) BURSTONE M.S. (1958a): Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol-AS-phosphates.
J. Nat. Cancer Inst. 21(3), 523.

23) BURSTONE M.S. (1958b): The relationship between fixation and techniques for the histochemical lokalisation of hydrolytic enzymes.
J. Histochem. Cytochem. 6, 322.

24) BURTON J.F. (1954a): Histologic demonstration of alkaline phosphatase and nonspecific esterase by azo-dye methods.
Nature (London) 173, 642.

25) BURTON J.F. (1954b): Histochemical demonstration of acid phosphatase by improved azo-dye method.
J. Histochem. Cytochem. 2, 88.

26) CHESSICK R.D. (1953a): Esterases of the brain.
J. Histochem. Cytochem. 1, 373.

27) CHESSICK R.D. (1953b): Histochemical study of distribution of esterases.
J.Histochem. Cytochem. 1, 471.

28) CLARKSON T.W. u. J.E.KENCH (1958): Uptake of lead by human erythrocytes in vitro.
Biochem. J. 69, 432.

29) CORNER G.W. (1944): Alkaline phosphatase in the ovarian follicles and in the corpora lutea.
Science 100, 270.

30) COTSON S. u. S.J.HOLT (1958): Studies in enzyme cytochemistry. IV. Kinetics of aerial oxydation of indoxyl and some of its halogen derivates.
Proc. Roy. Soc. B 148, 506.

31) DANIELLI J.F. (1953): Cytochemistry. A critical approach. New Jork. John Wiley a. Sons.

32) DEANE H.W. (1952): Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

the estroue cycle.
Amer. J. Anat. 91, 363.

33) DEANE H.W., R.J.BARRNETT u. A.M.SELIGMAN (1950): Handbuch der Histochemie. Band VII/I Enzyme 1.Teil. Fischer Verlag Stuttgart.

34) DEANE H.W., B.L.LOBEL u. S.L.ROMNEY (1952): Enzymatic histochemistry of normal human ovaries of the menstrual cycle, pregnancy and the early puerperium. Am. J. Obstetr. a. Gynec. 83, 281.

35) DELSOL M. u. A.CHAUX (1954): Les localisations histochimiques des phosphatases acides dans le tractus génital femelle de la souris. Modifications expérimentales.
C. R. Soc. Biol. Paris 148,2 , 1180.

36) DHOM G. (1954 u.1955): Morphologische, quantitative und histochemische Studien zur Funktion der Hiluszellen des Ovars.
Z. Geburtsh. 142, 182 u. 289.

37) DHOM G. u. H.J.MENDE (1956): Die alkalische Phosphatase in den Hiluszellen des Ovars.
Virchows Arch. 328, 337.

38) DOYLE W.L. u. R.LIEBELT (1954): Diffusion of esterase after fixation.
Anat. Rec. 118, 384.

39) DUBREUIL G. (1950): Les glandes endocrines de l´ovaire féminin. Leur variabilité, leurs variations d´après des observations morphologiques personelles.
Gynec. et Obstetr. 49, 137.

40) DE DUVE C. u. J.BERTHET (1954): The use of differential centrifugation in the study of tissue enzymes.
Int. Rev. Cytol. 3, 225.

41) DE DUVE C., B.C.PRESSMAN, R.GIANETTO, R.WATTIAUX u. F.APPELMANS (1955): Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat-liver tissue.
Biochem. J. 60, 604.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

42) DE DUVE C. (1959): The function of intracellular hydrolases.
Exp. Cell. Res. Suppl. 7, 169.

43) EGER W. u. H.F.GELLER (1952): Zum Nachweis der alkalischen Phosphatase in der Leber am nativen Gefrierschnitt.
Virchows Arch. 322, 645.

44) EICHNER D. (1959): Zur Histologie und Topochemie der Netzhaut des Menschen.
Z. Zellforsch. 48, 137.

45) ERÄNKÖ O. (1951): Demonstration of acid phosphatase in tissue sections; improved method.
Ann. med. exper. et biol. Fenniae 29, 287.

46) ERÄNKÖ O. (1952): On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase.
Acta anat. 16, suppl. 17,

47) ERÄNKÖ O. u. L.LEHTO (1954): Distribution of acid and alkaline phosphatases in human metanephros.
Acta anat. 22, 277.

48) FEKETE E. (1953): A morphological study of the ovaries of virgin mice of inbred strains showing quantitative differences in their hormone producing components.
Anat. Rec. 117, 93.

49) FETZER S., J.HILLEBRECHT u. H.E.MUSCHKE (1955): Zur Morphokinese der interstitiellen Zellen des Ovariums der Ratte.
Naturwiss. 42, 302.

50) VAN FLEET D.S. (1962): Histochemistry of enzymes in plant tissues.
Handb. der Histoch. VII/2, 1.

51) FISHMAN W.H. u. F.LERNER (1953): A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin.
J. biol. Chem. 200, 89.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

52) FOLLEY S.J. u. H.D.KAY (1935): The phosphatases. Ergebn. Enzymforsch. 5, 159.

53) FORD D.H. u. A.HIRSCHMAN (1955): Alkaline phosphatase activity in the ovaries of immature and maturing albino rats. Anat. Rec. 121, 531.

54) FUIOCCHIO F., N. LOMBARDO u. G.LO SARGO (1956): Alkaline phosphomonoesterase in corpus luteum during estrous in goats, relation to periodic acid-Schiff reactivity. Boll. Soc. ital. biol. sper. 32, (10-11), 1382.

55) FUIOCCHIO F., G. LO SARGO (1958): Alkaline phosphomonoesterase in the primordial ovarian follicle, and in various phases of the estrous cycle in the hircus goat. Biol. lat. Milano 11(4), 572.

56) GENESI S.G. (1953): Alkalische Phosphatasen im Ovar. Minerva ginecol. 5, 302.

57) GIANETTO R. u. C. DE DUVE (1955): Comparative study of the binding of acid phosphatase, ß-glucuronidase and cathepsin by rat-liver particles. Biochem. J. 59, 433.

58) GÖSSNER W. (1958): Histochemischer Nachweis der hydrolytischen Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. Untersuchungen zur Methodik und vergleichenden Histotopik der Esterasen und Phosphatasen bei Wirbeltieren. Z. Zellforsch., Abt. Histochemie 1, 48.

59) GOETSCH J.B. u. P.M.REYNOLDS (1951): Obtaining uniform results in the histochemical technic for acid phosphatase. Stain Techn. 26, 145.

60) GOETSCH J.B., P.M.REYNOLDS u. H.BUNTING (1952): Modification of GOMORI method for alkaline and acid phosphatase avoiding artefact staining of nucleus. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 80, 71.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

61) GOLDBERG B. u. H.W.JONES jr. (1953): Acid phosphatase in human female genital tract; histochemical and biochemical study.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 83, 45.

62) GOMORI G. (1939): Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 42, 23.

63) GOMORI G. (1941): Distribution of acid phosphatase in the tissues under normal and under pathologic conditions.
Arch. Path. 32, 189.

64) GOMORI G. (1945): The microtechnical demonstration of sites of lipase activity.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 58, 362.

65) GOMORI G. (1946): Distribution of lipase in the tissues under normal and under pathological conditions.
Arch. Path. 41, 121.

66) GOMORI G. (1949): Histochemical localization of true lipase.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 72; 697.

67) GOMORI G. (1950a): Improved histochemical technic for acid phosphatase.
Stain Techn. 25, 81.

68) GOMORI G. (1950b): Methods of study for tissue lipase. In: Menstruation and its disorders.
C.C. Thomas, Springfield III, pp. 52.

69) GOMORI G. (1952a): The histochemistry of esterases.
Int. Rev. Cytol. 1, 323.

70) GOMORI G. (1952b): Microscopic histochemistry.
Univ. Chicago Press. Chicago.

71) GOMORI G. (1953): Human esterases.
J. Lab. Clin. Med. 42, 445.

72) GOMORI G. (1955): Histochemistry of human esterases.
J. Histochem. Cytochem. 3, 479.

73) GOMORI G. (1956): Histochemical methods for acid

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 453.

74) GOMORI G. u. R.D.CHESSICK (1953): Histochemical studies of the inhibition of esterases.
J. coll. comp. Physiol. 41, 51.

75) GOMORI G. u. H.B.COUTINHO (1953): Selective inactivation of esterase by alcohol.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 83, 809.

76) GOODLAD G.A.J. u. G.T.MILLS (1957): The acid phosphatases of rat liver.
Biochem. J. 66, 346.

77) GREEN H. u. O.MEYERHOF (1952): Synthetic action of phosphatase. III. Transphosphorylation with intestinal and semen phospnatase.
J. biol. Chem. 197, 347.

78) GROGG E. u. A.G.E.PEARSE (1952): Critical study of histochemical technics for acid phosphatase, with description of azo-dye method.
J. Path. a. Bact. 64, 627.

79) HANRIOT M. (1896): Sur un nouveau ferment du sang.
C. R. Soc. Biol. (Paris) 48, 925.

80) HERMAN E. u. H.A.PADYKULA (1956): The effects of mercurials and cysteine on acid phosphatase and glucose-6-phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 4, 443.

81) HOFFMANN-OSTENHOF O. (1954): Enzymologie.
Springer Verlag.

82) HOLT S.J. (1952): A new principle for tne histochemical localization of hydrolytic enzymes.
Nature (London) 169, 271.

83) HOLT S.J. (1954): A new approach to the cytochemical localization of enzymes.
Proc. Roy. Soc. 142 B, 160.

84) HOLT S.J. (1956): The value of fundamental studies of staining reactions in enzyme histochemistry,

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

with reference to indoxyl methods for esterases. J. Histochem. Cytochem. 4, 541.

85) HOLT S.J. (1958a): Indigogenic staining methods for esterases.
In: General Cytochemical Methods. Danielli J.F. ed. p.375. Vol 1. Acad. Press Inc. N.Y.

86) HOLT S.J.(1958b): Studies in enzyme cytochemistry. V. An appraisal of indigogenic reactions for esterase localization.
Proc. Roy. Soc. 148 B, 520.

87) HOLT S.J. u. R.F.J.WITHERS (1952): Cytochemical localization of esterases using indoxyl derivatives.
Nature (London) 170, 1012.

88) HOLT S.J. E.E.HOBBIGER u. G.L.S.PAWAN (1960): Preservation of integrity of rat tissue for cytochemical staining purposes.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 383.

89) HUNTER R.L. u. K.M.KNEISKE (1957): Quantitative study of non-specific esterase in the rat ovary.
J. Histochem. Cytochem. 5 (2), 154.

90) JIRÁSEK J. (1961): Zur Lokalisation der unspezifischen Esterasen im menschlichen Eierstock.
Arch. f. Gyn. 196, 359.

91) KAUFMANN C. (1953): Corpus luteum.
Arch. f. Gyn. 183, 264.

92) KÖNIG P.A. u. K.B.MAHARAJ (1962): Klinische, morphologische und histochemische Untersuchungen über den Fruchttod bei Tubargravidität.
Therap. Umschau 19, 331.

93) KÖNIG P.A. u. B.UHSADEL (1962): Funktion und Regression des Corpus luteum graviditatis in Morphologie und Histochemie.
Gynaecologia 154, 129.

94) KORNBERG A. u. W.E.PRICER (1953a): Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

acids.
J. Biol. Chem. 204, 329.

95) KORNBERG A. u. W.E.PRICER (1953b): Enzymatic eterification of 1-glycerophosphate by long chain fatty acids.
J. Biol. Chem. 204, 345.

96) KRISHNAMURTHY S., P.SESHADRY SASIRY u. J.GANGULY (1958): Studies on Vitamin A-esterase. The intracellular distribution of Vitamin A-esterase and cholesterol-esterase in chicken liver.
Arch. Biochem. Biophys. 75, 6.

97) KROON D.B. (1952): Phosphatase and the formation of protein-carbohydrat complexes.
Acta anat. 15, 317.

98) LASSEK A.M. (1947): The stability of so-called axonal acid Phosphatase as determined by experiments in its stainability.
Stain Techn. 22, 133.

99) LEUTHARDT F. (1959): Lehrbuch der physiologischen Chemie.
Verlag W. de Gruyter u. Co.

100) LOBEL B.L., R.M.ROSENBAUM u. H.W.DEANE (1951): Enzymic correlates of physiological regression of follicles and corpora lutea in ovaries of normal rats.
Endocrinology 68, 232.

101) LONDON M. u. P.B.HUDSON (1955): Identy of phosphotransferase and phosphomonoesterase of human prostate and of sera from patients with prostatic cancer.
Biochim. Biophys. Acta 17, 485.

102) LOVENHART A.G. (1906): Are the animal enzymes concerned with the hydrolysis of various esters identical?
J. Biol. Chem. 2, 427.

103) LUDEWIG S. u. A.CHANUTIN (1950): Distribution of enzymes in the livers of control and X-irradiated

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

rats.
Arch. Biochem. Biophys. 29, 441.

104) MALATY H.A. u. G.H.BOURNE (1954): The distribution of "simple" esterases in human tissues.
Acta anat. (Basel) 21, 249.

105) MALONE T.E. (1960): Observations on the histochemical localization of alkaline glycerophosphatase in developing corpora lutea of albino rats.
Amer. J. Anat. 106, 41.

106) MARC QUEN J. u. W.MONTAGNA (1950): Lipase activity in the ovary of the laboratory mouse.
Anat. Rec. 106, 281.

107) MARK D.D. (1950): Distribution of lipase in preneoplastic and neoplastic states induced in the rat liver by para-dimethylaminoazobenzene.
Arch. Path. 49, 545.

108) MARKERT C.L. u. R.L.HUNTER (1959): The distribution of esterases in mouse tissues.
J. Histochem. Cytochem. 7, 42.

109) MARTIN B.F. (1953): The histochemical test for lipase.
Nature (London) 172, 1048.

110) MC GREGOR S.M. u. H.E.STEET (1953): The carbohydrat nutrition of tomato roots. IV. The nature and localization of acid phosphatase.
Ann. Bot. (London) 17, 385.

111) MC KAY D.G., J.H.PINKERTON, A.T.HERTIG u. S.DANZIGER (1961): The adult human ovary, a histochemical study.
Ann. Anat. Path. (Paris) 6, 189.

112) MENTEN M.L., J.JUNGE u. M.H.GREEN (1944): Distribution of alkaline phosphatase in kidney following the use of histochemical azo dye test.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 57, 82.

113) MENTEN M.L., J.JUNGE u. M.H.GREEN (1944): A coupling histochemical azo dye test for alkaline phospnatase in the kidney.
J. Biol. Chem. 153, 471.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

114) MEYERHOF O. u. H.GREEN (1950): Synthetic action of phosphatase. II. Transphosphorylation by alkaline phosphatase in the absence of nucleotides.
J. Biol. Chem. 183, 377.

115) MILIO G. (1960): Observations on the alkaline phosphatase activity of the luteo-follicular apparatus of the human ovary.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 36, 62.

116) MILIO G. u. V.CAPRIA (1960): Observations on the alkaline phosphatase activity of the luteo-follicular apparatus.
Biol. Lat. (Milano) 13, 219.

117) MINARD F.N. (1953): The inhibition of the action of pancreatic lipase by esters of polyoxyethylene sorbitan.
J. Biol. Chem. 200, 657.

118) DE MOERLOOSE M. (1961): Aktivität und Wirkung von Gallensalzen auf die Pankreaslipase.
Pure Appl. Chem. 3, 433.

119) MORTON R.K. (1953): Transferase activity of hydrolytic enzymes.
Nature (London) 172, 65.

120) NACHLAS M.M. u. A.M.SELIGMAN (1949a): The histochemical demonstration of esterase.
J. Nat. Cancer Soc. 9, 415.

121) NACHLAS M.M. u. A.M.SELIGMAN (1949b): Evidence for the specifity of esterase and lipase by the use of three chromogenic substrates.
J. Biol. Chem. 181, 343.

122) NACHLAS M.M., A.C.YOUNG u. A.M.SELIGMAN (1957): Problems of enzymatic localization by chemical reactions applied to tissue.
J. Histochem. Cytochem. 5, 565.

123) NEWMAN W., E.A.KABAT u. A.WOLF (1950): V. A difficulty in enzyme localization in the acid range due to selective affinity of certain tissues for

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

lead, in dependence on pH.
Amer. J. Path. 26, 489.

124) NOVIKOFF A.B., E.PODBER, J.RYAN u. E.NOE (1953): Biochemical heterogeneity of the cytoplasmatic particles isolated from rat liver homogenates.
J. Histochem. Cytochem. 1, 27.

125) NOVIKOFF A.B. (1955): Histochemical and cytochemical staining methods.
In: R.C.Mellors, Analytical Cytology, Chap. 2
Mc Graw-Hill, New York.

126) NOVIKOFF A.B. (1959): Lysosomes and the physiology and pathology of cells.
Biol. Bull. 117, 385.

127) NOVIKOFF A.B. (1961): Lysosomes and related particles.
In: The cell Vol. II Chap. 6
Ed. by J.Brachet u. A.Mirsky, Acad. Press, N.Y.

128) OBER K.G. (1950): Changing activity of alkaline phosphatase in endometrium and ovary during menstrual cycle and in myometrium during labor; histochemical demonstration.
Klin. Wochenschr. 28, 9.

129) OGAWA K., N.MIZANO u. M.OKAMOTO(1961): Lysosomes in cultured cells.
J. Histochem. Cytochem. 9, 202.

130) OMACHI A., C.P.BARNUM u. D.GLICK (1948): Quantitative distribution of an esterase among cytoplasmatic components of mouse liver cells.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 67, 133.

131) ONNIS A. u. M.MEGA (1957): Histochemische Forschungen über die Lipase der weiblichen Genitalorgane. Histotopographie der Lipase.
Attualita Ostetr. e Ginec. 3, 301.

132) PALADE G.E. (1951): Intracellular localization of acid phosphatase; comparative study of biochemical and histochemical methods.
J. Exper. Med. 94, 535.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

133) PEARSE A.G.E. (1953): The intracellular localization of esterases.
J. Path. Bact. 66, 331.

134) PEARSE A.G.E. (1954a): Azo dye methods in enzyme histochemistry.
Int. Rev. Cytol. 3; 329.

135) PEARSE A.G.E. (1954b)(2.Auflage 1960): Histochemistry, theoretical and applied.
London: J. u. A.Churchill.

136) PEARSON B. u. V.DEFENDI (1957): A comparison between the histochemical demonstration of non-specific esterase activity by 5-Bromoindoxyl-acetate, 1-naphthyl-acetate and naphthol-AS-acetate.
J. Histochem. Cytochem. 5, 72.

137) PERRINI F. u. P.BOEMI (1953): Histochemische Untersuchungen über die saure Phosphatase von Ovar, Salpinx und Uterus der Ratte. Wirkung der synthetischen Ovarialhormone.
Clin. Ostetr. e Ginec. 17, 99.

138) PRATT O.E. (1953): The proportion of phosphatase activity demonstrable in brain by histological technics.
Biochem. J. 55, 140.

139) PRATT O.E. (1954): Some factors affecting rat brain phosphatase activity in fresh tissues suspensions and in histochemical methods.
Biochim. Biophys. Acta 14, 380.

140) PULLE C. (1960): Lipase-Aktivität und Steroidbildung im Follikel bzw. Gelbkörperorgan der Frau.
Arch. Ostetr. Ginec. 65, 387.

141) RAVIN H.A. u. A.M.SELIGMAN (1953): Determinants for the specifity of pancreatic lipase.
Arch. Biochem. Biophys. 42, 337.

142) REBOLLO M.A. (1955): Some aspects of the histogenesis of retina.
Acta neurol. latinoamer. 1, 142.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

143) RICHTER D. u. P.G.CROFT (1942): Blood esterases.
Biochem. J. 36, 746.

144) RICHTERICH R. (1952): Technik der histochemischen Demonstration von Esterasen.
Acta anat. 14, 263.

145) RICHTERICH R. (1958): Enzymopathologie. Enzyme in Klinik und Forschung.
Springer Verlag.

146) ROBISON R. (1923): The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification.
Biochem. J. 17, 286.

147) ROCHE J. (1952): Phosphatases.
In: The Enzymes. J.B.Sumner u.U.Myrbäck Bd.1, 473.

148) RUTENBURG A.M. u. A.M.SELIGMAN (1954): New method for the histochemical demonstration of acid phosphatase.
J. Histochem. Cytochem. 2, 445.

149) RUTENBURG A.M. u. A.M.SELIGMAN (1955): The histochemical demonstration of acid phosphatase by a post-incubation coupling technic.
J. Histochem.Cytochem. 3, 455.

150) RUTENBURG A.M. u. A.M.SELIGMAN (1956): Protein binding of azo dyes tissue homogenates.
J. Histochem. Cytochem. 4, 17.

151) SCARPELLI D.B. u. A.G.E.PEARSE (1958): Physical and chemical protection of the cell constituents and the precise localization of enzymes.
J. Histochem. Cytochem. 6, 369.

152) SCHNEIDER A.J. u. H.S.LORING (1956): The synthetic activity of prostatic phosphatase in the presence of cytidine and inorganic phosphate.
J. Biol. Chem. 220, 129.

153) SELIGMAN A.M. u. L.H.MANHEIMER (1949): A new method for the histochemical demonstration of acid phosphatase.
J. Nat. Cancer Inst. 9, 427.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

154) SELIGMAN A.M., H.H.CHAUNCEY u. M.M.NACHLAS (1951): Effect of formalin fixation on the activity of five enzymes of rat liver.
Stain Techn. 26, 19.

155) SHNITKA T.K. u. A.M.SELIGMAN (1951): Role of esteratic inhibition on localization of esterase and the simultaneous cytochemical demonstration of inhibitor sensitive and resistant enzyme species.
J. Histochem. Cytochem. 9, 504.

156) SNEATH P.H.A. (1950): Histochemical demonstration of lipase.
Nature (London) 166, 699.

157) STEDMAN E. u. E.STEDMAN (1931): Studies on relationship between chemical constitution and physiological action; inhibitory action of certain synthetic urethanes on activity of liver esterase.
Biochem. J. 25, 1147.

158) STERNBERG W.H. (1949): Morphology, androgenic function, hyperplasia and tumors of the human ovarian hilus.
Amer. J. Path. 25, 493.

159) STIEVE H. (1949): Anatomisch nachweisbare Vorgänge im Eierstock des Menschen und ihre umweltbedingte Steuerung.
Geburtsh. u. Frauenheilk. 9, 639.

160) SUMNER J.B. u. G.F.SOMERS (1953): Chemistry and methods of enzymes.
Ed. 3 Academic Press, New York.

161) TAKAMATSU H.(1939): Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase. Histochemische Untersuchungstechnik der Phosphatasen und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben.
Trans. Soc. Pathol. Japan 29, 492.

162) TAKEUCHI T. u. S.UTSUNOMIJA (1952): Sensivity of the cytochemical technic for phosphatase.
Acta Path. Jap. 4, 227.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

163) TANDLER C.J. (1953): The use of cobalt acetate in the histochemical technic for acid phosphatase. J. Histochem. Cytochem. 1, 151.

164) VAN THOAI N., J.ROCHE u. L.SARTORI (1944): Isolement et cristallisation de la phosphatase alcaline du rein (phosphomonoestérase). C.R. Soc. Biol. 138, 47.

165) UNDERHAY E., S.J.HOLT, H.BEAUFAY u. C.DE DUVE (1956): Intracellular localization of esterase in rat liver. J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 635.

166) VERNE J. u. S.HÉBERT (1952a): Les activités phosphatasique et esterasiques dans les follicoles et les corps jaune de l'ovaire de la rate blanche. C.R. Soc. de Biol. 146, 390.

167) VERNE J. u. S.HEBERT (1952b): Etude cytochimique de l'activité esterasique dans les glandes endocrines hormonogènes. Annales d'endocrinologie 13, 659.

168) VERNE J. (1956): Ein neuer Aspekt der Histologie durch die Lokalisation der Enzyme. Cytochemische Studie über alkalische Phosphatasen und Esterasen. Aertl. Forsch. 10, 157.

169) WACHSSTEIN M. (1946): Influence of experimental kidney damage on histochemically demonstrable lipase activity in the rat. Comparison with alkaline phosphatase activity. J. Exp. Med. 84, 25.

170) WALLART J. (1939): Zur Frage der interstitiellen Eierstockdrüse des Menschen. Z. Zellforsch. A29, 100.

171) WALKER B.S., H.M.LEMON, M.M.DAVISON u. M.K.SCHWARTZ (1954): Acid Phosphatases. A review. Amer. J. Clin. Path. 24, 807.

172) WATZKA M. (1957): Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. VII. Band/3.Teil. Weibliche Geschlechtsorgane. Das Ovar. Springer Verlag.

LITERATURVERZEICHNIS (Forts.)

173) WHITE R.F., A.T.HERTIG, J.ROCK u. E.ADAMS (1951): Histological and histochemical observations on the corpus luteum of human pregnancy with special reference to corpora lutea associated with normal and abnormal ova.
Carnegie Contr. Embryol. 34, 222.

174) WILLSTÄTTER R.U. u. F. MEMMEN (1924): Vergleich von Leberesterase mit Pankreaslipase. Über die stereochemische Spezifität der Lipasen.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chemie 138, 216.

175) WOLF A., E.A.KABAT u. M.NEWMAN (1943): Histochemical studies on tissue enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system.
Amer. J. Path. 19, 423.

176) YAO T. (1950): Cytochemical studies on the embryonic development of Drosophila melanogaster. II. Alkaline and acid phosphatases.
Quart. J. Micr. Sci. 91, 79.

177) YASUDA T. u. K.DOI (1953): Histochemical studies on histogenesis of lutein tissue in the rabbit ovary.
Med. J. Osaka Univ. 4, 241.

178) YIN H.C. (1945): A histochemical study of the distribution of phosphatase in plant tissues.
New. Phytl. 44, 191.

179) ZANDER K. (1957): Die Gestagen-wirksamen Hormone im Organismus.
Geburtsh. Frauenheilk. 17. 876.

LEBENSLAUF

Am 29. 12. 1939 wurde ich als Tochter des Marineoffiziers Artur Dzubiel und seiner Ehefrau Isolde geb. Laib in Friedrichshafen am Bodensee geboren. Ich besuchte dort von 1945 - 1949 die Volksschule und ab 1949 das naturwissenschaftliche Graf-Zeppelin-Gymnasium, wo ich im März 1958 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1958 immatrikulierte ich mich an der Universität Tübingen, wo ich im Sommersemester 1959 das Kleine Latinum und das Vorphysikum ablegte. Im April 1961 bestand ich in Tübingen das Physikum und im Dezember 1964 das medizinische Staatsexamen.

Seit April 1962 bin ich mit dem Dipl.- Chemiker Dr. Siegfried Hörnle verheiratet.

Xerografie - Druck
Chemoprint OHG
Gießen